

SÉRIE A, N° 545

N° D'ORDRE

1269

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

ERNEST PINOY

Docteur en médecine,
Licencié ès sciences physiques et ès sciences naturelles,
Préparateur à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — RÔLE DES BACTÉRIES DANS LE DÉVELOPPEMENT
DE CERTAINS MYXOMYCETES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 18 juin 1907, devant la Commission d'examen.

MM. CHATIN,
HAUG,
MATRUCHOT,

président.
} examinateurs

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1907

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

M M.

Doyen..... P. APPELL, *Professeur* Mécanique rationnelle.
Doyen honoraire.. G. DARBOUX, — Géométrie supérieure.

Professeurs
honoraires.

{ L. TROOST.
Ch. WOLF.
J. RIBAN.

Professeurs

LIPPMANN Physique.
BOUTY..... Physique.
BOUSSINESQ Physique mathém. et calcul des probabilités.
PICARD..... Analyse supérieure et algèbre supérieure.
H. POINCARÉ..... Astronomie mathém. et mécanique céleste.
Y. DELAGE Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
G. BONNIER..... Botanique.
DASTRE..... Physiologie.
DITTE Chimie.
GIARD..... Zoologie, évolution des êtres organisés.
KÖNIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
VÉLAIN..... Géographie physique.
GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
CHATIN..... Histologie.
PELLAT..... Physique.
HALLER..... Chimie organique.
JOANNIS..... Chimie (Enseignement P. C. N.).
JANET..... Physique — —
WALLERAND..... Minéralogie.
ANDOYER..... Astronomie physique.
PAINLEVÉ..... Mathématiques générales.
HAUG Géologie.
TANNERY..... Calcul différentiel et calcul intégral.
RAFFY..... Application de l'analyse à la géométrie.
HOUSSAY..... Zoologie.
N..... Chimie biologique.
N..... Zoologie, anatomie, physiologie comparée.
N..... Physique.
N..... Chimie.
PUISEUX..... Mécanique et astronomie.
LEDUC..... Physique.
HADAMARD..... Calcul différentiel et calcul intégral.
MATRUCHOT..... Botanique.
MICHEL..... Minéralogie.
DAGUILLON..... Botanique.
BOUVEAULT..... Chimie organique.
BOREL..... Théorie des fonctions.
G. PRUVOT..... Anatomie comparée.
CAULLERY..... Zoologie.

Professeurs-
adjoints.

Secrétaire A. GUILLET.

SÉRIE A, N° 545

N° D'ORDRE

1269

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

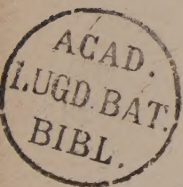
ERNEST PINOY

Docteur en médecine,
Licencié ès sciences physiques et ès sciences naturelles,
Préparateur à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — RÔLE DES BACTÉRIES DANS LE DÉVELOPPEMENT
DE CERTAINS MYXOMYCETES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 18 juin 1907, devant la Commission d'examen.



MM. CHATIN,
HAUG,
MATRUCHOT,

président.

} examinateurs

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE

98-100, RUE HOUDAN, 98-100

1907

ROLE DES BACTÉRIES

dans le développement de certains Myxomycètes

PAR ERNEST PINOY

INTRODUCTION

Les Myxomycètes constituent un matériel de choix pour le biologiste qui veut étudier la chimie et la physiologie cellulaire. Les masses protoplasmiques parfois considérables que forment certains d'entre eux, comme *Æthaliium septicum*, *Spumaria alba*, etc., ont permis à Pfeffer, Stahl, Metchnikoff, d'élucider bien des points intéressants pour la biologie générale. Les travaux de de Bary, Brefeld, Van Tieghem, Lister, Strasburger, Woronin, Jahn, Olive nous ont fait connaître le cycle évolutif et la morphologie de ces êtres. Cependant, s'il reste beaucoup à faire sur ce sujet pour les chercheurs, cela vient de la difficulté d'obtenir le matériel en état au moment voulu, cela vient de ce que les conditions de développement des Myxomycètes sont imparfaitement connues.

La méthode pasteurienne, qui a donné de si beaux résultats dans le domaine de la cryptogamie, n'a pour ainsi dire pas été appliquée à l'étude des Myxomycètes; quelques auteurs, toutefois, ont fait des cultures pour étudier leur développement; mais ce sont des cultures où le plus souvent pullulaient des Amibes, des Flagellates, les Bactéries les plus variées et qui, par suite, n'offraient aucune des garanties de la technique rigoureuse établie par Pasteur et ses élèves. Dans le présent travail, en me servant de cette technique, j'étudierai d'abord les conditions de culture et de développement du *Dictyostelium mucoroides*, l'influence des Bactéries et du milieu de culture sur son développement et sur sa morphologie, la diastase intracellulaire que sécrètent ses myxamibes dans leurs vacuoles digestives. Puis j'examinerai si les faits observés chez cette Acrasiée ont une portée plus générale et je ferai l'exposé de mes recherches comparatives sur deux autres Acrasiées, le *Dictyostelium purpureum* Olive et

le *Polysphondylium violaceum* Brefeld, sur quelques Myxomycètes endosporés et plus particulièrement sur *Didymium difforme* Duby, *Didymium effusum* Link, enfin sur un Myxomycète parasite, le *Plasmodiophora brassicae* Woronin.

Ce travail a été commencé au laboratoire de M. le professeur Bonnier et terminé à l'Institut Pasteur, au laboratoire de M. le Dr Borrel.

Soit à la Sorbonne, soit à l'Institut Pasteur, mes maîtres ne m'ont ménagé ni leurs conseils, ni leurs encouragements. Aussi est-ce pour moi un devoir agréable à remplir que de leur adresser ici mes sincères remerciements. Que M. le professeur Bonnier, MM. les Drs Roux et Metchnikoff, MM. Matruchot et le Dr Borrel, veuillent bien recevoir l'hommage de ma profonde reconnaissance.

MM. Mesnil, le Dr Nicolle, Delezenne m'ont souvent donné d'utiles renseignements ; M. Boudier, M. le professeur Mangin, M. le professeur Thaxter, MM. les Drs Binot et Delacroix m'ont aimablement fourni des matériaux d'études, je leur exprime toute ma gratitude.

I

RECHERCHES SUR *Dictyostelium mucoroides*

Les Myxomycètes acasiés vivent sur les crottins de divers animaux, sur les Champignons pourris, plus rarement sur le bois mort. Ils se laissent assez facilement cultiver sur les milieux artificiels. Aussi a-t-on pu suivre leur développement, soit en gouttes pendantes, soit dans des tubes de culture. Les auteurs qui les ont tout d'abord étudiés, Brefeld (3), Van Tieghem (33), ne se sont pas préoccupés d'avoir des cultures pures. Nadson, (21) le premier, a attiré l'attention sur le rôle que pouvaient jouer les Bactéries dans ces cultures. Il cultive *Dictyostelium mucoroides* avec *Bacillus fluorescens* var *liquefaciens*. Pour ce savant, il y a symbiose entre le *Dictyostelium mucoroides* et la Bactérie, la Bactérie n'agissant que par l'alcalinisation du milieu. Pourtant il est possible, d'après lui, d'avoir quelques appareils de fructification, étiques, il est vrai, mais purs, sans Bactéries. Potts (26), conclut que le *Dictyostelium mucoroides* ne peut vivre qu'associé à une Bactérie. Vuillemin (34) aurait vu toutefois des myxamibes se développer sans Bactéries et constate en outre qu'il y a des

Bactéries dans les vacuoles et qu'elles y sont digérées. Ce dernier résultat est en opposition absolue avec les observations de Potts. Potts n'a jamais constaté de Bactéries dans les vacuoles des myxamibes du *D. mucoroides*; il croit pouvoir démontrer en outre que les Bactéries sont solubilisées par une diastase extracellulaire. Des corps de Bactéries, notamment de *Bacterium fimbriatum*, tuées par le chloroforme, suffiraient pour la culture de *D. mucoroides*. En résumé, les questions pendantes sont les suivantes :

1^o Peut-on obtenir un léger développement du *D. mucoroides* sans Bactéries ?

2^o Les Bactéries ne servent-elles qu'en préparant des aliments solubles pour le *D. mucoroides*? Y a-t-il une diastase extracellulaire ou une diastase intracellulaire ?

Dans les recherches que je vais exposer, je tâcherai de répondre à ces divers points.

OBTENTION DE LA CULTURE PURE MIXTE DE *Dictyostelium mucoroides*.

Le *Dictyostelium mucoroides* qui fait l'objet de cette étude a été rencontré sur une Pezize pourrie dans la forêt de Carnelles. La tête sporifère et le pied étaient blancs dans les jeunes exemplaires; ils devenaient jaunâtres chez les échantillons plus âgés. Les spores elliptiques mesuraient en moyenne 2 μ , 5 sur 4 μ . Quelques spores étaient de dimensions plus grandes pouvant aller de 3 μ à 5 μ . Le pied de l'appareil sporifère était long et flexueux. Sa longueur dépassait 1 centim. Pourtant il y avait quelques appareils dont le pied ne mesurait pas plus de 2 millimètres.

La petite gouttelette d'une tête sporifère, constituée par des spores plongées dans du mucus, fut prélevée à l'aide d'une spatule flambée. On prenait soin de ne pas emporter le pied en même temps. L'ensemencement fut fait tout d'abord sur des tranches de carottes stérilisées contenues dans des tubes de Roux. La première culture obtenue sur ce milieu s'est développée en 3 jours à la température de 22°. Cette culture n'était pas pure et renfermait des Bactéries. A l'examen microscopique, il paraissait n'y avoir qu'une seule espèce bactérienne; on voyait en effet des Bacilles mobiles, de même dimension, ne prenant pas le Gram.

Cependant, d'une part, pour avoir la certitude qu'il n'y avait qu'une seule espèce bactérienne, d'autre part pour pouvoir étudier cette Bactérie, il était nécessaire de faire une séparation.

Dans ce but, j'ai encore prélevé aussi purement que possible une petite gouttelette sporifère dans un des tubes de culture que je venais d'examiner, puis je l'ai diluée dans du bouillon et à l'aide de ce bouillon j'ai fait, suivant la technique usuelle, la séparation en boîtes de Petri sur gélatine ordinaire. Les colonies bactériennes séparées se sont montrées exclusivement formées par une Bactérie fluorescente liquéfiante. Quoique les colonies, macroscopiquement et microscopiquement, aient paru pures, pour éviter la possibilité d'un germe étranger, à l'aide d'une colonie diluée de même dans le bouillon, j'ai fait une nouvelle séparation sur gélatine. C'est en partant d'une colonie ainsi obtenue que j'ai poursuivi l'étude de la Bactérie isolée, par l'ensemencement sur les milieux dont on se sert couramment en bactériologie.

Cette Bactérie, comme nous l'avons vu plus haut, est un Bacille mobile, ne prenant pas le Gram. Elle est de petites dimensions de $1\ \mu$ à $2\ \mu$ de longueur, la largeur atteint à peine $0\ \mu, 5$.

Sur plaques de gélatine, les colonies bien visibles au bout de 2 jours sont rondes, grisâtres. Elles ne tardent pas à montrer tout autour une zone de liquéfaction qui se teint en vert clair, fluorescent. Le bouillon se trouble rapidement; il se forme un voile à la surface, puis, un dépôt muqueux se fait au fond du tube de culture. Le bouillon a une belle fluorescence vert jaunâtre. Sur pomme de terre, l'ensemencement donne une strie jaune brunâtre luisante. Sur gélose, les colonies sont grises et fluorescentes. Le pigment fluorescent diffuse dans le milieu. Sur le milieu d'épreuve de Gessard, il n'y a pas production de pyocyanine. Cette Bactérie n'a pas de spores; elle ne se développe pas à une température supérieure à 35° . Mise en tubes capillaires en milieu liquide, elle est tuée à 56° en 2'.

L'ensemble des caractères de cette bactérie nous permet de la rapprocher du *Bacillus fluorescens* var *liquefaciens* (Flügge). Ainsi, comme l'avait fait Nadson, j'ai obtenu une culture mixte du *Dictyostelium mucoroides* avec le *Bacillus fluorescens* var *liquefaciens*.

Etait-il possible d'obtenir une culture pure ?

Les milieux de culture solides et transparents qui ont été utilisés par les auteurs sont très divers ; ceux qui donnent les meilleures résultats sont l'agar peptonée et glucosée, l'agar au bouillon de maïs. La gélatine au bouillon de maïs a pu servir à Potts parce que la Bactérie qui était associée dans ses cultures et qu'il décrit comme nouvelle sous le nom de *Bacterium fimbriatum* ne liquéfiait pas la gélatine.

Après des essais comparatifs, le milieu de culture qui m'a donné le plus grand rendement, ce que l'on juge facilement au nombre de fructifications produites dans la culture, est la gélose à la graine de lin. Ce milieu donne d'ailleurs également de très bons résultats pour la culture des Amibes et des Infusoires.

Voici sa composition :

Pour un litre d'eau, 20 grammes de gélose, 50 grammes de graines de lin. Chauffer à 117°. Répartir dans les vases de culture et stériliser à 115° pendant 1/4 d'heure.

Ce milieu ne peut se filtrer ; si on veut l'obtenir clair, il faut, après le premier chauffage, verser la gélose dans un large entonnoir dont l'extrémité est bouchée, mettre à l'étuve à 37° de manière à ce que la gélose se refroidisse moins vite et reste plus longtemps liquide. Dans ces conditions, toutes les impuretés tombent au fond de l'entonnoir. Quand la gélose a fait prise, on détache le bloc de l'entonnoir, on coupe la calotte inférieure, le sommet du cône, qui contient les impuretés, on met le reste à fondre, puis on distribue et on stérilise.

Ceci établi, prenons des spores de *D. mucoroides* dans la culture pure mixte, diluons dans l'eau ordinaire stérilisée et avec un tampon de coton stérile imbibé de cette dilution, suivant la technique que Metchnikoff a employée pour la séparation du vibron cholérique, frottons successivement la surface de la gélose à la graine de lin contenue dans 3 boîtes de Pétri. Ayant opéré ainsi, si nous examinons au bout de 3 jours, nos plaques placées à la température de 22°, nous verrons que seulement là où il y a une colonie bactérienne, les spores ont germé, des myxamibes se sont formées qui ont édifié des appareils de fructification.

Dans les autres points, où il n'y a pas eu de développement

bactérien, les spores sont parfaitement conservées, n'ayant pas germé. Devons-nous comme l'ont fait Nadson, Potts, Vuillemin, considérer ces spores comme pures ?

Nullement. En effet, si nous ensemençons ces spores dans du bouillon, nous voyons au bout d'un temps plus ou moins long, généralement 6 à 8 jours, le bouillon se troubler et devenir fluorescent. Nadson, Potts, Vuillemin, n'ont pas tenu compte des germes qui pouvaient se rajeunir : ceci explique, comme nous allons le voir, certaines de leurs observations.

Je devais chercher à obtenir des spores pures :

Pour cela, comme le Bacille fluorescent ne possède pas de spores, on peut employer divers procédés.

On peut soumettre les spores de *D. mucoroides* à l'action des vapeurs d'éther ou de chloroforme.

J'ai mis à profit le fait que le Bacille fluorescent associé était tué en milieu humide à une température de 50° prolongée pendant une heure. Dans les mêmes conditions, 80 0/0 des spores de *D. mucoroides* sont encore capables de germer.

Il est possible aussi de purifier les spores de *D. mucoroides* par un chauffage de 2' à 56°. On les met en suspension dans l'eau ordinaire et on enferme le tout dans des tubes capillaires. Les spores un peu âgées, d'au moins huit jours, sont les plus résistantes.

Des spores ainsi purifiées peuvent être mises sur tous les milieux de culture et ne germent jamais. Elles ne germent que si on leur adjoint une Bactérie convenable. On vérifie ainsi d'une manière absolue que les spores de *D. mucoroides* ne germent qu'en présence d'une Bactérie.

Les cultures pures de Nadson, le début de développement sans Bactéries observé par Vuillemin, s'expliquent par une légère culture bactérienne arrêtée par l'action nocive des produits excrétés par le Myxomycète, notamment du mucus, et aussi, comme nous le verrons, par sa bactériophagie.

L'expérience suivante que j'ai faite avec le Dr Dujardin-Beaumetz est particulièrement démonstrative.

Des spores pures de *D. mucoroides* furent ensemencées sur carotte avec une grande quantité de Bacilles de la peste provenant d'une culture jeune sur gélose. La quantité de Bacilles déposés sur la carotte était visible à l'œil nu. Dans ces conditions,

au bout de 5 jours, la carotte était recouverte d'abondantes fructifications de *D. mucoroides*.

On sait la fragilité du Bacille de la peste; un ensemencement pratiqué dans du bouillon avec le contenu de la carotte demeura stérile. L'examen terminal nous donnait donc une culture pure, sans aucun doute, analogue à celles de Nadson. Les cultures de Nadson étaient étiques parce qu'il n'y avait eu qu'un faible développement de Bactéries; ici les cultures étaient luxuriantes, parce que nous avons mis une grande quantité de Bacilles de la peste.

Ce qui d'ailleurs aurait dû mettre en garde les auteurs qui ont cru obtenir une culture pure, c'est que de telles cultures ne sont pas repiquables. Or, les spores sont parfaitement normales; il suffit d'ensemencer en même temps une Bactérie convenable pour avoir d'autres cultures.

Ainsi les spores du *D. mucoroides* se comportent comme les kystes des Amibes. En effet, Frosch (10), puis Zaubitzer (36), qui ont réussi à purifier des kystes d'Amibes par l'action de la soude caustique à 20 0/0, n'ont pu obtenir de cultures d'Amibes qu'en ajoutant aux kystes, sur les milieux où ils les ensemençaient, des Bactéries vivantes. Les résultats de Tsujitani (32), qui serait parvenu à cultiver des Amibes avec des Bactéries tuées à une température peu élevée n'ont pas été confirmés. Tsujitani, pour purifier ses kystes, employait le vieillissement et la dessiccation. Ses cultures n'étaient dues vraisemblablement qu'à un rajeunissement des germes.

Potts dit aussi qu'il a réussi à cultiver *D. mucoroides* avec des corps de *Bacterium fimbriatum* tués par le chloroforme, mais la pureté des spores qu'il ensemait était illusoire. L'ensemencement sur milieux solides ne peut servir de vérification.

Je suis parvenu à avoir un léger début de culture des spores pures de *D. mucoroides* en opérant de la façon suivante :

Un flacon de 250 grammes de capacité environ, à large ouverture, est rempli à moitié avec un milieu nutritif liquide, (milieu minéral de Gessard, milieu à la dextrine). On y fait plonger un sac de collodion porté à l'extrémité d'un tube. Ce tube est fermé par un bouchon de coton et est maintenu dans le goulot du flacon à l'aide d'un fort tampon d'ouate.

Le tout est stérilisé à 110° à l'autoclave. On ensemence

alors le liquide extérieur avec du *Bacillus fluorescens* et l'on sème des spores pures de *D. mucoroides* à l'intérieur du sac. Dans ces conditions, on observe la germination des spores de *D. mucoroides*, mais les amibes formées ne tardent pas à s'arrondir; leur protoplasme devient clair et vitreux; elles se détruisent. J'ai ajouté dans le sac des corps de *Bacillus fluorescens* tués de diverses manières (à 56° en 2', avec de l'éther, avec du chloroforme, etc.) sans résultat. Les myxamibes n'ont jamais évolué.

En résumé, le *D. mucoroides* ne peut vivre qu'en association avec une Bactérie vivante. Toutes les Bactéries ne conviennent pas également; on conçoit qu'à ce point de vue la composition du milieu de culture ait une grande importance. Suivant le substratum employé, les diverses Bactéries peuvent donner des produits différents.

Il y a donc lieu d'étudier maintenant l'action réciproque du milieu de culture et de la Bactérie associée sur le développement de *D. mucoroides*.

INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE ET DE LA BACTÉRIE SUR LE DÉVELOPPEMENT DE *Dictyostelium mucoroides*.

Nous verrons immédiatement l'influence du milieu de culture, si nous ensemençons la culture pure mixte de *D. mucoroides* sur la pomme de terre. Sur ce milieu, quelle que soit la Bactérie associée, on n'observe aucune culture de l'Acrasiée. Avec la plupart des Bactéries, il en est de même sur la gélose au bouillon de viande, sur gélose peptonée, si on n'y ajoute pas de sucres (lactose, maltose, glucose). Toutefois *B. mégatherium* permet le développement à condition d'être associé avec une autre Bactérie, *B. fluorescens* par exemple.

Au début de mes expériences, j'avais cru que c'était le développement exagéré des Bactéries qui nuisait à celui du Myxomycète.

En effet, les observations de Chrzaszcz (5), sur une myxamibe de *Physarum leucophæum* (*Physarum nutans* Pers), qui se nourrit de levures, avaient montré que dans ses cultures, très impures d'ailleurs, quand l'un des deux organismes devenait florissant, l'autre était étouffé.

Cette conception du phénomène n'est que relativement exacte. Chrzaszcz ne s'est pas occupé dans ses recherches des germes étrangers et de la variation de composition du milieu de culture. Si une Bactérie ou une Levure sur un substratum donné produisent quelques substances nuisibles au Myxomycète, il est évident que plus leur végétation sera luxuriante, moins ce dernier pourra vivre.

Au contraire, constituons un milieu tel que la Bactérie ou la Levure s'y développent très abondamment sans donner de produits nocifs, le rendement de la culture du Myxomycète sera proportionnel à celui de la culture de la Bactérie ou de la Levure. Les myxamibes, qui sont mobiles, évitent en effet très bien l'étouffement en montant à la surface des colonies microbiennes. Ces conditions favorables sont réalisées dans la culture pure mixte du *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* sur la gélose à la graine de lin. Sur ce milieu, la Bactérie donne une riche culture et le rendement de la récolte de *D. mucoroides* est maximum.

Maintenant, constituons un milieu de la manière suivante :

1^o Gélose à l'eau à 3 0/0. Répartir dans les vases de culture et stériliser.

2^o Ajouter dans chaque vase de culture, parties égales de la solution suivante stérilisée :

Dextrine 15 grammes, azotate de calcium 2 grammes, phosphate monobasique de potasse 0, 50, azotate de potasse 0, 50, sulfate de magnésie 0,50. Eau 300.

Sur ce milieu, la culture du *B. fluorescens* est tout aussi riche, mais celle de *D. mucoroides* est beaucoup moindre et elle est d'autant moindre que le *B. fluorescens* s'est plus développé. On apprécie nettement ce fait dans les cultures successives.

Dans les premières cultures, la Bactérie non acclimatée au milieu, pousse moins bien et le Myxomycète donne une végétation satisfaisante. Dans les cultures filles, les Bactéries acclimatées se multiplient davantage, les fructifications de *D. mucoroides* mettent un temps beaucoup plus long à se former et sont rares, souvent même la fructification avorte. On note parfois une sorte de transformation de *D. mucoroides* en Guttuline : le pied ayant complètement avorté, il se forme seulement à la surface du substratum une petite gouttelette de mucus contenant les spores; à la base existent de grandes amibes vacuolaires, plus

ou moins arrondies, qui ont une ébauche de paroi cellulosique, se colorant en bleu par l'action de l'acide iodhydrique fumant iodé.

Sur la gélose à la graine de lin, ainsi que sur d'autres milieux (carotte, gélose peptonée et sucrée) j'ai pu réaliser par l'ensemencement des spores pures de *D. mucoroides* avec diverses espèces de Bactéries, des cultures pures mixtes.

On peut obtenir de telles cultures avec *Bacillus coli*, *Bacillus friedländeri*, *Bacillus kielii*, *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus violaceus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio metchnikovi*, et en général avec la plupart des Bactéries qui ne prennent pas le Gram à l'exception de *Bacillus pyocyaneus*.

Cependant la variété noire de ce dernier Bacille, variété étudiée par Gessard, permet la culture. Elle ne donne pas de tyrosinase en association.

Les Bactéries qui prennent le Gram. comme *Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus anthracis*, ne conviennent pas; s'il y a culture, c'est qu'il y a association avec une Bactérie étrangère.

L'association de deux Bactéries peut même permettre la végétation de *D. mucoroides* sur des milieux où il ne vit pas en culture pure mixte. C'est ainsi que *Bacillus megatherium* permet la culture *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* sur la gélose de viande.

Lorsque, dans une culture pure mixte de *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* on ajoute *B. subtilis*, on observe généralement que les pieds des appareils sporifères sont plus longs et qu'il y a fréquemment des formes ramifiées. Il est certain qu'il n'est pas indifférent, pour la morphologie de l'Acrasiée, que le Myxomycète soit associé avec telle ou telle Bactérie; nous en verrons des exemples en étudiant l'action des pigments des Bactéries chromogènes sur le *D. mucoroides*; mais auparavant nous devons nous demander quels sont les rapports réciproques de la Bactérie et de l'Acrasiée dans une culture pure mixte. Y a-t-il commensalisme, symbiose ou parasitisme?

PARASITISME DU *Dictyostelium mucoroides* SUR LES COLONIES BACTÉRIENNES. — DIGESTION DES BACTÉRIES A L'INTÉRIEUR DES VACUOLES DE SES MYXAMIBES.

Prenons, comme milieu de culture, le liquide de condensa-

tion d'un tube de gélose à la graine de lin et examinons, *in vivo*, en gouttes pendantes, dans une cellule de Van Tieghem, le développement d'une culture mixte de *D. mucoroides* avec *B. fluorescens*.

Aussitôt après la germination, la jeune myxamibe conserve encore quelque temps adhérente la membrane déchirée de la spore. Puis elle s'arrondit et présente une ou deux vacuoles, rarement davantage. S'il n'y a qu'une seule vacuole, elle est plus grande. L'observation de ces vacuoles montre qu'à certains moments elles peuvent se contracter; mais cette contraction n'est qu'occasionnelle et n'a pas la régularité de celle de la vacuole pulsatile des Amibes. Lorsque les myxamibes sortent de leur quiescence, leur protoplasme se différencie en un endoplasme granuleux plus ou moins vacuolaire et en un ectoplasme hyalin qui émet des pseudopodes. Les pseudopodes peuvent être très fins ou au contraire en forme de doigt de gant.

Diaphragmons l'éclairage du microscope et examinons à un fort grossissement, à l'immersion, nous verrons que les Bactéries s'agglutinent autour des myxamibes, se disposant perpendiculairement à leur ectoplasme, ou bien formant tout à l'entour de petits paquets étoilés.

Il s'agit là d'un phénomène assez analogue à celui que Mouton (20) a observé autour de la vacuole pulsatile d'une Amibe. Mouton a vu en effet que chez une Amibe en culture pure mixte avec *B. coli*, les Bacilles s'agglutinaient au voisinage de la vacuole pulsatile.

A l'intérieur des vacuoles, nous distinguerons des granulations plus ou moins réfringentes et des Bactéries en plus ou moins grand nombre. Parfois il n'y a qu'une seule Bactérie dans une vacuole.

Les myxamibes grossissent; puis elles se divisent en deux individus égaux. Ceux-ci ne tardent pas à devenir très vacuolaires, rampent vivement à la surface du substratum, émettent des pseudopodes parfois très longs; c'est alors qu'il est le plus facile de voir les Bactéries incluses dans les vacuoles. Ce stade de vie active survient dans les cultures de la 30^e à la 40^e heure.

En employant des techniques de coloration appropriées, il

est aisé de suivre alors toutes les phases de la digestion des Bactéries à l'intérieur des vacuoles des myxamibes de *D. mucoroides*.

On peut faire cet examen soit *in vivo*, soit sur des préparations fixées.

Le Neutralroth, déjà employé par Metchnikoff pour teindre les inclusions des vacuoles digestives chez les Turbellariées et les Actinies, par Mouton chez les Amibes, est certainement le colorant de choix pour la coloration *in vivo*. En effet, non seulement il colore les Bactéries en voie de digestion, mais aussi par la propriété qu'il possède de virer en jaune dans les milieux très alcalins et au contraire du rouge cerise au rouge pourpre dans les milieux acides, il renseigne sur la réaction alcaline ou acide du liquide des vacuoles.

Ce réactif ne colore que les éléments morts; aussi ne colore-t-il dans les myxamibes, en rouge foncé, que les Bactéries en voie de digestion et les granulations qui proviennent de leur destruction.

La coloration rouge foncé nous indique que le liquide des vacuoles est plus acide que le milieu extérieur. S'il y a un excès de colorant, les myxamibes seront tuées et finiront par se colorer.

La vésuvine permet aussi de bonnes colorations *in vivo* des Bactéries incluses dans les vacuoles des myxamibes.

Les préparations fixées et colorées nous donnent le moyen d'étudier ce que deviennent les Bactéries en voie de digestion dans les vacuoles digestives; à condition que la méthode de coloration employée donne le maximum de différenciation.

Comme pour les Amibes, la méthode qui donne les meilleurs résultats est celle de Laveran.

Un peu d'une culture sur graine de lin datant de 36 heures est dilué dans une goutte d'eau ordinaire sur un porte-objet. Cette goutte est étalée. On laisse sécher, puis on fixe à l'alcool absolu 10 minutes.

Ensuite on colore par le mélange de Laveran :

4 c. c. à 1 0/00 d'éosine à l'eau (de la fabrique de Höchst);

6 c. c. d'eau distillée.

1 c. c. de bleu Borrel.

Le bleu Borrel sera commodément préparé en mettant pour 100 grammes d'eau distillée : 1 gramme d'oxyde d'argent et

1 gramme de bleu de méthylène médicinal de Höchst. Il est bon de conserver dans un flacon jaune pour éviter la réduction du sel d'argent par la lumière. On laissera trois semaines en contact, en ayant soin d'agiter de temps à autre. Puis on filtrera. Le bleu peut être prêt beaucoup plus tôt, si on met le flacon à l'étuve à 37°. Cela dépend d'ailleurs beaucoup aussi de la qualité du bleu de méthylène.

Une fois la coloration effectuée, elle demande de 15 à 20 minutes, on différencie par le tannin en solution à 5 0/0.

Sur des préparations ainsi faites, l'endoplasme prend une couleur bleu violacé, l'ectoplasme se colore en bleu et les microbes en violet foncé. Le noyau, dont pour l'instant je laisserai de côté la morphologie, prend une coloration pourpre.

Les Bactéries incluses dans les vacuoles sont bien mises en évidence. Tandis que celles qui sont à l'extérieur des cellules prennent la couleur d'une manière intense, la plupart des Bactéries englobées sont gonflées et prennent une couleur très pâle. Parfois, prenant davantage l'éosine, elles sont plus rouges et on peut observer tous les passages entre des Bactéries d'un rouge violacé et les granulations qui se colorent en rouge, puis entre des Bactéries très pâles et des granulations qui prennent à peine la couleur. (Pl. II, fig. 26-30).

Si nous examinons de la même manière une culture mixte avec le vibron cholérique, nous n'observerons pas la mise en boule des vibrions à l'intérieur des vacuoles des myxamibes, comme on l'observe à l'intérieur des leucocytes dans le phénomène de Pfeiffer.

Les faits que je viens d'exposer concordent sensiblement avec les observations d'Olive (23), de Vuillemin, mais sont complètement en désaccord avec celles de Grimm et de Potts.

Ce dernier auteur n'a pas vu les Bactéries à l'intérieur des vacuoles de *D. mucoroides* parce que sa technique de fixation et de coloration était insuffisante.

La Bactérie associée dans ses cultures, le *Bacterium fimbriatum* Potts, dont il donne d'ailleurs une description morphologique assez incomplète, serait bien spéciale. Elle se colorerait seulement par le violet de gentiane et ne colorerait pas par le bleu de méthylène, le vert de méthyle, même la fuchsine.

Potts colore ses préparations de myxamibes par le violet de

gentiane après fixation à l'alcool. Dans ces conditions, il colore les Bactéries extérieures, tandis qu'il ne colore pas les corpuscules contenus dans les amibes. Ce résultat s'explique très bien par un défaut de fixation. Dans une préparation mal fixée en effet, le violet de gentiane qui est un colorant énergique colorera les Bactéries extracellulaires tandis qu'il ne colorera rien de ce qui est dans l'amibe; nous avons vu d'ailleurs que les Bactéries incluses sur des préparations bien fixées ne prennent souvent qu'une couleur très pâle parce qu'elles sont en voie de digestion.

Potts, n'ayant pas vu l'englobement des Bactéries par les amibes de *D. mucoroides*, admet l'existence d'une diastase extracellulaire. Pour cela Potts se fonde sur ce que : 1° dans des cultures faites avec *B. megatherium* on observe des formes d'involution et de destruction de cette Bactérie dans les colonies où se développe l'Acrasiée; 2° les colonies du *B. fimbriatum* sur lesquels vit *D. mucoroides* deviennent plus claires; 3° si on numère le nombre des colonies obtenues d'une part en partant d'une colonie de *B. fimbriatum* normale, d'autre part en partant d'une colonie identique sur laquelle *D. mucoroides* a fructifié, on obtient dans le premier cas 836 millions de Bactéries et dans le second seulement 19 millions. Il constate en outre, dans une culture de *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* var *liquefaciens*, que la Bactérie ne donne pas son pigment caractéristique dans les colonies où végète *D. mucoroides*.

Devons-nous considérer ces faits comme la preuve que *D. mucoroides* se nourrit à l'aide d'une diastase extracellulaire? Potts a négligé la modification du milieu, la sécrétion de mucine par les myxamibes de *D. mucoroides*, les phénomènes d'autolyse des Bactéries. Ce sont ces facteurs qui expliquent les formes d'involution des Bactéries et l'éclaircissement des colonies.

ÉTUDE DE LA DIASTASE INTRACELLULAIRE DE *Dictyostelium mucoroides*.

Nous venons de voir que les myxamibes de *D. mucoroides* se nourrissent par digestion dans leurs vacuoles de Bactéries englobées : à ce point de vue, contrairement à ce qu'ont cru certains auteurs, le *Dictyostelium mucoroides* ne diffère pas des autres Myxomycètes. Comme eux, il possède une diastase intra-

cellulaire. Depuis les travaux de de Bary (1), Celakowsky (4), Lister (14), Metchnikoff (18), nous savons que chez les Myxomycètes endospores, les zoospores, les myxamibes et les plasmodes sont capables d'ingérer et de digérer dans les vacuoles de leur protoplasme des Bactéries, des Algues, etc. Lister a bien décrit le processus. Par exemple, il a vu une zoospore de *Chondrioderma* (*Didymium*) *difforme* digérer complètement deux grands Bacilles dans l'espace d'une heure et demie. Ces Bacilles avaient été saisis par les pseudopodes de la zoospore, entraînés dans l'intérieur de leur protoplasme et là, logés dans les vacuoles, Lister les a vus devenir de moins en moins visibles et s'y dissoudre.

Metchnikoff en faisant ingérer des grains de tournesol finement pulvérisés à des plasmodes de Myxomycètes a démontré que le liquide des vacuoles est acide. Nous avons vu en prenant comme réactif le rouge neutre, qu'il en est de même pour les vacuoles de *D. mucoroides*. Devons-nous conclure avec Krukenberg que la diastase protéolytique qu'elles renferment est une pepsine? A l'exception du travail primordial de Krukenberg (13) et de celui plus récent de Schröder (29), faits tous deux en prenant comme matériel d'études *Æthaliium septicum*, aucune étude n'a été faite de la diastase intracellulaire des Myxomycètes. Or les travaux de ces deux auteurs ont à leur base une cause d'erreur qui n'est pas négligeable, comme j'aurai l'occasion de le démontrer : c'est la quantité énorme d'impuretés que renferment les plasmodes des Myxomycètes.

J'ai profité de ce que je pouvais associer au *Dictyostelium mucoroides* une Bactérie très peu protéolytique, qui ne liquéfie pas la gélatine, qui ne s'autolyse pas, comme le *Bacillus coli*, pour chercher à extraire la diastase intracellulaire de l'Acrasiée.

Dans ce but, j'ai, ainsi que l'avait fait Mouton pour la diastase intracellulaire des Amibes, ensemencé de grandes boîtes contenant de la gélose à la graine de lin, avec le *D. mucoroides* associé avec le *B. coli*.

Comme il est nécessaire, pour avoir une riche récolte de *D. mucoroides*, que la gélose soit humide et en couche épaisse, j'ai employé des boîtes analogues à celles de Roux mais dont l'une des faces porte une excavation pour loger la couche de gélose.

Pour plus de commodité dans l'opération de la récolte, ces boîtes, construites en collaboration avec M. Bridré, ont été faites en forme de triangle équilatéral. Cette forme permet de racler toute la surface de la boîte.

Les boîtes sont mises à l'étuve à 22° et la récolte est effectuée au moment où l'on voit le plus nettement chez les myxamibes l'englobement des Bactéries et leur digestion dans les vacuoles, c'est-à-dire vers la 40^e heure.

Les myxamibes produisant du mucus adhèrent très fortement à la gélose et il est très difficile, sinon impossible, de les mettre en suspension dans l'eau. Le mieux est de les récolter à sec avec une petite râcllette spécialement construite pour ne pas entamer la gélose.

La pâte formée par les amibes et les Bactéries est traitée par l'alcool absolu et rapidement évaporée dans le vide.

Il faut dix boîtes environ pour recueillir 0^{gr}, 005 sec. La substance sèche est pulvérisée dans un mortier et les 0^{gr}, 005 sont mis dans 5 c. c. d'eau. Le liquide obtenu est neutre ou très légèrement acide. On filtre sur papier, on centrifuge ; le liquide décanté dans le tube de centrifugation est encore un peu louche, mais il ne tarde pas à s'éclaircir. J'examinerai l'action de ce liquide diastasique successivement sur la gélatine, sur la fibrine, sur les corps de Bactéries, sur l'albumine.

Action sur la gélatine.

Mes recherches ont été faites avec de la gélatine à 20 0/0 que je ramenait à 10 0/0 par l'addition de liquide diastasique. Les expériences étaient faites dans de petits tubes à essais. Comme antiseptiques, ceux qui donnent le meilleur résultat sont le fluorure de sodium à 1 0/0, le chloroforme. Dans mes premières expériences, j'avais employé le xylol ; mais je me suis aperçu que le xylol n'offre aucune garantie et que le Staphylocoque peut végéter dans de la gélatine sous une couche de xylol.

Dans un tube mettons quantités égales de liquide diastasique et de gélatine fluorée amenée à être neutre à la phénol-phtaléine.

Dans un autre tube mettons quantités égales de la même gélatine avec du même liquide diastasique porté 5' à 100°.

Les deux sont mis à l'étuvé à 37°. On les examine au bout de 20 heures en les plongeant dans la glace.

Tandis que le tube qui contient le liquide diastasique non chauffé reste indéfiniment liquide, l'autre fait prise presque immédiatement.

On peut conclure de là que la diastase intracellulaire du *Dictyostelium mucoroides* — nous la désignerons sous le nom d'« acrasidiastase, » — liquéfie la gélatine, puisque le *B. coli* est sans action sur celle-ci.

Il est indispensable de savoir quelle réaction du milieu est la plus favorable pour la digestion de la gélatine par cette diastase.

En effet, il est intéressant de connaître à quel type de diastase nous avons affaire.

On sait que les animaux supérieurs possèdent deux types de diastases protéolytiques, l'une la pepsine qui digère en milieu nettement acide, formant aux dépens des matières albuminoïdes des peptones, l'autre la trypsine qui agit plutôt en milieu alcalin et qui transforme les matières albuminoïdes en peptones et en produits plus simples, tels que la leucine et la tyrosine. L'acrasidiastase est-elle une pepsine ou une trypsine? Si, ainsi que l'a fait Mesnil (17) pour l'étude de l'actinodiastase, nous constituons avec de la gélatine une gamme de milieux dont la réaction va de l'alcalinité à la phtaléine du phénol jusqu'à l'acidité au méthylorange, nous verrons que l'acrasidiastase n'agit que dans les milieux alcalins, neutres ou faiblement acides. A l'acidité au méthylorange, il n'y a plus du tout d'action.

A ce point de vue, l'acrasidiastase se rapproche donc de la trypsine.

L'acrasidiastase est très sensible à l'action de la température; elle est détruite à partir de 55°. En effet, quand elle a été chauffée à cette température, la gélatine à laquelle elle a été ajoutée fait prise presque immédiatement, après une digestion de 20 heures à 37°.

L'acrasidiastase agit à des températures peu élevées. Mais son action est alors très lente; il faut plusieurs jours de digestion à la température du laboratoire pour avoir une liquéfaction appréciable de la gélatine.

Son maximum d'action est vers 38°.

La digestion de la gélatine n'est pas poussée très loin et il n'y a pas formation de peptone.

Action sur la fibrine.

La fibrine que j'ai employée est de la fibrine de porc qui a été conservée dans la glycérine et que j'ai chauffée pendant 2 heures à 58° dans la solution physiologique de chlorure de sodium.

On sait que cette dernière précaution est absolument nécessaire parce que la fibrine, lors de la coagulation du sang, fixe sur elle une diastase protéolytique capable de la digérer.

La fibrine ainsi préparée est mise dans de petits tubes à essais contenant parties égales de solution physiologique et de liquide diastasique.

Dans les tubes mis à l'étuve, la fibrine devient grise, très friable, mais je ne l'ai jamais vue se dissoudre.

On peut dire que l'action sur la fibrine est presque nulle.

Sur l'albumine coagulée je n'ai obtenu aucune action.

Action sur les Bactéries.

L'acrasidiastase n'agit pas sur les Bactéries tuées par la chaleur. En revanche, si nous les tuons par l'éther ou le chloroforme, elles sont parfaitement dissoutes par le liquide diastasique.

La meilleure manière d'opérer est de faire ce qu'a fait Mouton pour l'étude de l'action de l'amibodiastase sur les corps de Bactéries.

Le meilleur test bactérien à prendre est encore le *Bacillus coli* qui ne s'autolyse pas ; une émulsion de *B. coli* chloroformée reste trouble.

Prenons une telle émulsion et ajoutons-en quelques gouttes à deux tubes : l'un contenant le liquide diastasique normal ; l'autre une même quantité de ce liquide bouilli. Ils sont mis à l'étuve à 38°. Or, de ces deux tubes, qui présentaient une égale opacité, l'un, le témoin, après quelques heures d'étuve, est toujours trouble, l'autre est devenu presque complètement transparent.

Il ne s'agit pas là d'un phénomène d'agglutination, car si l'on agite le tube clair, on voit qu'il n'y a aucun dépôt.

Si au lieu de *B. coli*, on prend *B. fluorescens*, l'éclaircissement est beaucoup plus rapide; seulement ici le témoin lui-même finira par s'éclaircir, parce que *B. fluorescens* s'autolyse.

En résumé, l'acrasidiastase se rapproche beaucoup de l'amibodiastase étudiée par Mouton.

Comme elle, elle digère la gélatine en milieu alcalin, neutre ou faiblement acide; elle ne paraît pas donner de peptones aux dépens de la gélatine: elle n'attaque pas l'albumine coagulée; comme elle, elle ne dissout pas les corps de Bactéries tuées par la chaleur, et au contraire, elle les dissout très bien quand elles sont tuées par le chloroforme. Elle semble en différer par son action sur la fibrine qui est presque nulle. La quantité de diastase contenue dans notre liquide était peut-être trop faible. Il est vrai que l'action de l'amibodiastase sur la fibrine n'est pas non plus très énergique et n'est pas comparable à celle de trypsiné.

Ainsi le *Dictyostelium mucoroides* ne peut se développer qu'avec des Bactéries; il est parasite des colonies bactériennes; ses myxamibes ingèrent les Bactéries et les digèrent dans leurs vacuoles à l'aide d'une diastase dont l'action est assez semblable à celle de l'amibodiastase.

Ces faits biologiques, que nous venons de constater chez le *D. mucoroides*, ont-ils une portée plus générale? Observe-t-on les mêmes faits chez d'autres Myxomycètes? Etudions d'abord ce qui se passe pour deux espèces de la même famille, le *Dictyostelium purpureum* Olive et le *Polysphondylium violaceum* Brefeld.

II

RECHERCHES SUR DEUX AUTRES ACRASIÉES.

CULTURES PURES MIXTES DE *Dictyostelium purpureum*.

Cette espèce m'a été aimablement envoyée par M. le professeur Thaxter à l'état de spores sur des crottes de souris.

J'ai pu réussir directement une culture par l'ensemencement de parcelles de ces crottes à la surface de gélose à la graine de lin.

En opérant de la même manière qu'avec le *D. mucoroides*, en prélevant avec soin et aseptiquement la gouttelette d'une tête sporifère, j'ai réussi d'autres cultures soit sur la gélose à la graine de lin, soit sur d'autres milieux (carottes, milieu à la dextrine), où le *Dictyostelium purpureum* n'était associé qu'avec une seule Bactérie. Je m'en suis rendu compte par l'ensemencement en bouillon et la séparation par la méthode des plaques. Je n'ai pu faire l'isolement en chauffant les spores et en les ensemençant ensuite avec la Bactérie, parce que les spores du *Dictyostelium purpureum* sont plus fragiles que celles du *Dictyostelium mucoroides* et ne supportent pas en milieu humide une température supérieure à 49°. J'ai dû pour avoir des spores pures employer l'action de l'éther ou du chloroforme.

La Bactérie qui est associée dans les cultures est une Bactérie mobile. Elle a la forme de bâtonnet à bouts arrondis d'une dimension de 1 μ , à 2 μ , 5 de largeur. La longueur est d'environ 0 μ , 4. Elle ne prend pas le Gram. Elle ne se développe pas au-dessus de 35°. Sur plaques de gélatine, les colonies visibles au bout de 2 jours sont rondes, blanches, légèrement surélevées. La gélatine n'est pas liquéfiée. Le bouillon se trouble rapidement ; il se forme un voile à la surface et un léger dépôt muqueux au fond du tube de culture. Le bouillon reste incolore. Sur pomme de terre l'ensemencement donne une strie jaunâtre. Sur gélose, la strie est blanche, grisâtre, avec reflets métalliques. Il était difficile de savoir à quelle espèce de Bactérie j'avais affaire. Toutefois, d'après sa morphologie, d'après quelques caractères de la culture en bouillon, d'après le caractère de la culture sur pomme de terre, je pensais qu'elle devait être voisine de *Bacillus fluorescens*. Aussi, suivant la méthode de Gessard, je fis l'ensemencement sur albumine d'œuf coagulée. L'albumine prit au bout de 3 jours, à la température de 22°, une magnifique fluorescence verte. Sur le milieu d'épreuve de Gessard, elle ne donnait pas de pyocyanine.

Il s'agissait donc d'une variété non liquéfiant de *Bacillus fluorescens* dont la propriété de donner la fluorescence dans les milieux usuels avait disparu.

J'ai constaté depuis que le *Bacillus fluorescens* var. *liquefaciens*, cultivé en association avec le *Dictyostelium mucoroides* depuis plus de 5 ans, ne donne plus de fluorescence ni dans le bouillon

ni sur la gélose. Son pouvoir liquéfiant a également diminué. Par piqûre en gélatine, au lieu d'une liquéfaction assez rapide, on n'a plus qu'une légère collerette de gélatine liquéfiée au bout de 15 jours. Un exemplaire de *Bacillus fluorescens*, var. *liquefaciens* recueilli par M. le Dr Binot au mont Blanc et conservé dans la collection de l'Institut Pasteur, ne liquéfie plus la gélatine actuellement. Il est très probable que toutes les espèces fluorescentes qui ont été créées dans ces derniers temps ne sont que des variétés d'une seule et même espèce, *Bacillus fluorescens*.

Dans mes cultures, le *Dictyostelium purpureum* présente bien les caractères assignés par la diagnose d'Olive. La tête et le pied sont pourpres ou violets; à maturité ils deviennent presque noirs. Sa coloration est certainement beaucoup plus intense que celle du *Polysphondylium violaceum*. Je n'ai jamais rencontré de formes ramifiées. Le pied peut être très long et dépasse souvent 1 c. c. de hauteur. La tête est en général beaucoup plus grosse que celle du *Dictyostelium mucoroides*, quoique de dimensions variables. Les spores sont ordinairement ovales, mesurant 3μ - 5μ sur 5μ - 8μ .

On peut constater, comme nous l'avons fait pour le *D. mucoroides*, que les spores pures de *Dictyostelium purpureum* ne germent que si on leur adjoint une Bactérie convenable. Comme pour le *D. mucoroides*, toutes les Bactéries ne conviennent pas également et ce sont les *B. coli*, *B. fluorescens* qui donnent les cultures les plus abondantes. *D. purpureum* pousse mieux sur les milieux peptonés et sur le milieu à la dextrine que *D. mucoroides*.

Le *Dictyostelium purpureum* comme le *D. mucoroides* est parasite sur les colonies bactériennes.

Répetons en effet la même expérience qu'avec *D. mucoroides*.

Prenons des spores d'une culture pure mixte de *D. purpureum* et une fois mises en suspension dans l'eau stérilisée, repartissons-les en employant la même technique que précédemment sur la surface de trois boîtes Petri contenant de la gélose à la graine de lin. Sur les plaques placées à l'étuve à 22°, nous verrons, ordinairement au bout de 4 à 5 jours, qu'il n'y a eu de développement et formation d'appareils sporifères que là où il y a des colonies bactériennes.

Dans les vacuoles des myxamibes de *Dictyostelium purpureum*, comme dans celles de *D. mucoroides*, on voit des Bactéries en voie de digestion, soit que l'on examine *in vivo* avec le neutralroth ou la vésuvine, soit que l'on examine des préparations fixées et colorées. (Pl. III, fig. 1-3.)

Pour étudier la diastase protéolytique contenue dans les vacuoles de *D. purpureum*, j'ai suivi la même méthode que pour étudier l'acrasidiastase de *D. mucoroides*.

Avant d'exposer le résultat de ces recherches, je désire attirer l'attention sur un fait intéressant, fait que l'on ne rencontre pas chez *D. mucoroides*.

D. mucoroides associé à des Bactéries qui ne liquéfient pas la gélatine comme *B. coli*, *B. fluorescens* var *non liquefaciens*, *B. fimbriatum* (d'après Potts), en culture pure mixte sur gélatine à la graine de lin (le milieu est préparé comme la gélose; on met 15 0/0 de gélatine), n'a aucune action sur ce milieu; au contraire les colonies de *D. purpureum* avec *B. fluorescens* var *non liquefaciens* ou avec *B. coli* ne tardent pas sur ce milieu à s'entourer d'une collerette de liquéfaction. Ce fait est à rapprocher d'une observation de Beyerinck sur *Amœba zymophila*. Cette espèce d'Amibe rencontrée en association avec des Levures avait été isolée de raisins attaqués par des guêpes et en voie de fermentation spontanée. En employant comme milieu de culture l'extrait de malt gélatiné, l'auteur parvint à obtenir cet Amibe en culture pure mixte soit avec une Levure, soit avec un ferment acétique.

Or, tandis que ni la Levure, ni le ferment ne liquéfient la gélatine, la liquéfaction se produit très rapidement avec les Amibes.

Ici, comme *Amœba zymophila* ne possède pas de vacuole pulsatile, la diastase ne peut provenir d'un liquide rejeté par l'amibe; elle doit donc sortir de l'amibe soit par osmose, soit par expulsion avec des résidus de digestion.

Les myxamibes de *D. purpureum* ont la même structure que celles de *D. mucoroides*. Peut-être le mucus excrété fixe-t-il de la diastase dans un cas et n'en fixe pas dans l'autre, à cause d'une légère différence de composition?

Si l'on ensemence *D. purpureum* avec le *B. fluorescens* non liquéfiant, dans le lait, il y a végétation de l'Acrasiée et en

même temps acidification et coagulation du lait. Or la variété non liquéfiant de *B. fluorescens* ne coagule pas le lait, et le lait de culture est alcalin. On doit donc voir encore là le fait d'une diastase de *D. purpureum*.

Si nous préparons un extrait diastasique de *D. purpureum*, nous verrons que cette nouvelle acrasidiastase se comporte de la même façon que celle de *D. mucoroides*.

Son maximum d'action est vers 38°; elle digère la gélatine en milieu alcalin, neutre ou légèrement acide. Elle a peu d'action sur la fibrine. Elle ne digère pas l'albumine coagulée par la chaleur, les corps de Bactéries tuées par la chaleur. Elle dissout les Bactéries tuées par l'éther ou le chloroforme.

CULTURES PURES MIXTES DE *Polysphondylium violaceum*.

J'ai pu étudier cette espèce, grâce à une culture faite par Olive qui m'a été obligeamment transmise par M. le professeur Thaxter. Cette culture n'étant pas une culture pure mixte, il y avait diverses Bactéries associées.

En opérant comme je l'ai fait pour les deux autres Acrasiées, j'ai eu la culture pure mixte de *P. violaceum* avec la variété non liquéfiant de *B. fluorescens*, semblable à celle qui se trouvait avec *D. purpureum*.

P. violaceum croît bien sur divers milieux, sur gélose à la graine de lin, sur agar peptoné et sucré; mais le milieu sur lequel il donne une culture vraiment luxuriante est le milieu à la dextrine. Les tubes sont remplis d'un véritable lavis de fructifications.

On peut avoir des cultures pures mixtes de *P. violaceum* avec diverses Bactéries. Il ne diffère pas à ce point de vue des deux autres Acrasiées.

Sa culture pure mixte avec *B. fluorescens* non liquéfiant, sur gélatine à la graine de lin, se comporte comme celle de *D. purpureum*; il y a liquéfaction. De même la culture faite dans le lait le coagule. Les mêmes observations peuvent se faire sur la digestion des Bactéries dans les vacuoles des myxamibes en employant les mêmes techniques de coloration que pour les deux autres espèces. (Pl. III, fig. 4-7.)

L'agglutination des Bactéries autour des myxamibes de

P. violaceum est beaucoup plus intense qu'autour de celles de *D. mucoroides* et de *D. purpureum*.

Presque toujours un grand nombre de Bactéries agglutinées accompagnent les myxamibes lors de la formation de l'appareil sporifère. Ces Bactéries plongées dans la gaine muqueuse qui entoure le pied se placent perpendiculairement aux cellules du pied, si bien qu'à un examen superficiel on pourrait croire le pied hérissée de cristaux. Souvent aussi les Bactéries forment de véritables amas au niveau des ramifications.

L'extrait diastasique préparé à partir des myxamibes de *P. violaceum* est identique à l'acrasidiastase isolée précédemment : même action sur la gélatine, sur les corps de Bactéries tuées par le chloroforme ; action presque nulle sur la fibrine : action nulle sur l'albumine coagulée par la chaleur.

ACTION DE QUELQUES CONDITIONS EXTÉRIEURES : OXYGÈNE, HUMIDITÉ,
LUMIÈRE.

Les espèces d'Acrasiées que nous venons d'étudier sont strictement aérobies.

En anaérobiose, avec des Bactéries anaérobies, on n'observe aucun développement.

Il suffit d'ailleurs de fermer à la lampe un tube où se développe une culture pure mixte pour arrêter le développement.

L'humidité est nécessaire pour l'obtention des cultures. Elle influe beaucoup sur la morphologie de l'appareil sporifère. En milieu peu humide, les pieds sont courts, les têtes petites. Au contraire, en milieu humide, les pieds sont plus longs et les têtes beaucoup plus grosses.

Lorsque le milieu est très humide, ce qui se produit dans les cultures sur carottes en tubes de Roux, quand il y a beaucoup de liquide dans le fond, les têtes sporifères peuvent devenir plus de deux fois plus grosses. Dans ce cas, le mucus qui entoure les spores est dilué ; il se dépose au bas de la gouttelette et la tête offre une partie supérieure transparente et une partie inférieure opaque.

A l'obscurité, les appareils sporifères sont toujours perpendiculaires au substratum. Ce fait est dû vraisemblablement, comme le pense Olive, à une hydrotaxie négative.

A la lumière, il y a phototaxie positive et si, par exemple, une culture est disposée de manière à avoir une portion obscure et une portion éclairée, les pieds s'allongeront vers la partie éclairée. On peut obtenir ainsi un allongement assez considérable des fructifications, comme le montre la photographie ci-jointe d'une culture de *D. purpureum*. La flèche indique le sens de la lumière. (Pl. I, fig. 1.)

La température qui convient le mieux pour la culture de ces Acrasiées est comprise entre 22° et 25°.

A partir de 28°, il n'y a plus de développement. Au contraire les températures même basses jusqu'à 8° peuvent convenir; seulement la durée du développement est beaucoup plus grande, demandant, vers 8°, plusieurs semaines.

Certaines conditions extérieures influent aussi sur la variation des caractères spécifiques d'une Acrasiée.

Par suite de la chaleur de l'été de 1906 et d'un accident survenu à l'étuve, mes cultures de *D. mucoroides* se sont trouvées pendant plusieurs semaines à une température de plus de 40°. Alors, sur 20 tubesensemencés, quoique j'y aie ajouté *B. fluorescens*, deux tubes seulement ont donné une culture.

Dans ces cultures, au lieu du pied long et flexueux des fructifications produites dans les cultures pures mixtes de *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* sur graine de lin, les pieds sont extrêmement petits, n'ayant souvent même pas 1 millimètre de hauteur. La tête est plus grosse. Les spores ont de 3 à 4 μ sur 4 à 5 μ .

Les cultures repiquées depuis septembre 1906 ont conservé ces caractères qui sont très voisins de ceux du *Dictyostelium brevicaule* Olive.

ÉTUDE DE L'ACTION DES PIGMENTS BACTÉRIENS

Matruchot (15) a montré que les pigments bactériens peuvent être employés pour la coloration d'organismes à l'état vivant. En faisant végéter simultanément sur un même milieu une Bactérie chromogène et un Champignon filamenteux, on obtient une imprégnation du protoplasme du Champignon par le pigment sécrété hors de la Bactérie. Cette action de la matière colorante

est élective, le pigment ne se fixe que sur une partie du protoplasme. Les pigments fongiques, à condition qu'ils soient excrétés en dehors du Champignon chromogène, se comportent de la même manière que les pigments bactériens.

Je résumerai brièvement ici les résultats obtenus par Matruchot (15) de manière à mettre en parallèle ceux que donne la même méthode pour l'étude du *Dictyostelium mucoroides*.

En cultivant *Mortierella reticulata* avec *Bacillus violaceus* ou avec *Fusarium polymorphum*, Matruchot vit que le pigment de la Bactérie ou du Champignon se fixe sur le protoplasme et que cette coloration permet de déceler une structure particulière du protoplasme de *Mortierella reticulata*. En effet, tandis que la partie jeune des filaments, à l'extrémité en voie de croissance par exemple, ne présente aucune structure différenciée du protoplasme (on y voit seulement de très fins granules), les parties moyennement âgées du mycélium offrent une structure intéressante. Dès que le protoplasme n'est plus très jeune et cesse d'être homogène, il se fait une séparation de deux protoplasmes différents : 1° un protoplasme parfaitement hyalin, indifférent au réactif colorant, constituant une sorte de hyaloplasme ; 2° un protoplasme légèrement granuleux fixant la matière colorante et au milieu duquel se forment des gouttelettes huileuses de plus en plus abondantes, qui, plus fortement encore que le protoplasme, fixent le réactif colorant. Ce protoplasme granuleux correspond à l'enchylema de certains auteurs. Enfin, dans l'enchylema, le pigment vert du *Fusarium* et surtout la violacéine de *B. violaceus* coloraient de petits corps que l'auteur assimile sous réserve à des noyaux. Car même lorsque la coloration est nettement accusée, ce pseudo-noyau se montre constitué uniquement par un granule colorable de dimensions variables (0 μ , 5 de diamètre en moyenne) et, quel que soit le grossissement employé, on ne peut y distinguer la structure caractéristique : membrane enveloppante, zone claire périphérique, nucléole central.

En résumé les pigments bactériens et fongiques permettent de colorer chez *Mortierella reticulata* les cordons d'enchylema, les gouttelettes d'huile et sans doute aussi le nucléole central des noyaux.

Voyons ce qui se produira si nous associons par exemple

Dictyostelium mucoroides avec une bactérie chromogène comme *Bacillus kielii*.

Il y a lieu de distinguer deux cas : ou bien le milieu de culture est très favorable au développement de la Bactérie et à son pigment ; ou bien le milieu, tout en permettant le développement de la Bactérie, ne convient pas très bien à la production du pigment et dans ce cas la production du pigment est lente.

Dans le 1^{er} cas, comme cela a lieu pour le milieu à la dextrine, la production du pigment est rapide. Les spores sont pénétrées par le pigment avant leur germination. Leur membrane reste incolore ; mais leur protoplasme se colore en rouge intense ; souvent même la masse nucléaire est colorée ; on n'y distingue pas le karyosome. Dans ces conditions, elles sont tuées par le colorant et ne germent pas. Si certaines d'entre elles ont le temps de germer avant d'être atteintes par le pigment, l'amibe formée s'arrondit et son protoplasme se résout en granules fortement colorés au milieu desquels on peut parfois distinguer le noyau. Le développement ne va pas plus loin.

Dans le 2^e cas au contraire, sur la graine de lin par exemple, les colonies du *Bacillus kielii* sont d'abord blanches et ne deviennent rouges que tardivement, après 40 heures environ. Alors les spores germent. Les jeunes myxamibes ne se colorent pas ; on distingue seulement quelques granulations rouges dans les vacuoles. Dans une culture plus âgée, à côté d'éléments presque incolores, renfermant seulement dans leurs vacuoles des granulations rouges et des Bacilles colorés, il y a des éléments imprégnés qui montrent une différenciation très nette de l'endoplasme et de l'ectoplasme. L'endoplasme seul est coloré. On peut voir sur les individus colorés ainsi à l'état vivant (ils émettent des pseudopodes) que l'endoplasme qui incolore paraît granuleux, n'est pas constitué par des granulations, mais par un reticulum très visible enfermant dans ses mailles un protoplasme incolore hyalin.

Avec le pigment du *Bacillus kielii*, on voit très rarement le noyau coloré ; s'il est coloré, c'est d'une façon massive ; karyosome et zone périphérique sont confondus.

Ensuite vient le rassemblement des amibes, puis la forma-

tion de l'appareil sporifère. Les grosses cellules vacuolaires que l'on rencontre presque toujours à la base du pied de l'appareil sporifère sont généralement colorées d'une manière intense, si la fructification s'est formée sur une colonie pigmentée. Quant à la fructification elle-même, elle peut être colorée ou incolore.

La coloration de la fructification est due à la coloration du mucus qui l'entoure toute entière. En effet, la membrane des cellules du pied n'est pas imprégnée, mais on voit très bien les limites des cellules noyées dans un mucus coloré. Il en est de même pour la tête sporifère; on a une fausse coloration de la membrane des spores. Il se condense, en effet, du mucus très coloré à leur surface. Parfois le protoplasme lui-même des spores est coloré; dans ce dernier cas, comme nous l'avons vu plus haut, elles sont tuées; elles sont incapables de germer.

Lorsque la culture est faite sur carottes lavées et stérilisées, la plupart des fructifications sont colorées en rose. Ici les spores sont généralement incolores montrant seulement un liseré rose de mucus déposé à la surface de leur membrane. Il en est de même pour les cellules du pied.

Au lieu du *Bacillus kielii*, mettons en association le *Bacillus violaceus* sur le milieu à la dextrine qui est très favorable à la production de la violacéine. Nous ferons de nouveau la remarque que si la Bactérie donne immédiatement un pigment abondant le développement peut être nul. Cependant la violacéine paraît moins nocive pour *D. mucoroides* que le pigment du *Bacillus kielii*; il y a le plus souvent simplement un retard dans la germination et au bout de 3 à 4 jours, on observe sur le milieu de culture d'abondantes myxamibes. Un grand nombre de ces myxamibes sont colorées.

La coloration par la violacéine est plus délicate que celle obtenue avec le rouge de Kiel. Le reticulum de l'endoplasme se voit nettement, le contour des vacuoles est plus accusé. En même temps, souvent le noyau est coloré et alors le colorant se fixe exclusivement sur le karyosome central. Si le noyau est en voie de division, les chromosomes seuls sont colorés. D'après cela, il paraît évident que les corpuscules colorés vus par Matruchot dans les cordons d'enchyrama de *Mortierella reticulata* sont bien les nucléoles des noyaux.

Les fructifications sont incolores ou colorées, comme nous l'avons vu précédemment avec *B. kili*.

Si les fructifications sont colorées, les membranes des cellules du pied et des spores restent incolores. Seulement, elles sont entourées de mucus fortement violet. Les noyaux des cellules du pied sont presque toujours colorés.

Si nous faisons des cultures semblables avec *Dictyostelium purpureum* et *Polysphondylium violaceum*, nous observerons aussi des phénomènes de coloration de leurs myxamibes, mais tandis que *D. purpureum* se comporte comme *D. mucoroides*, il en est tout autrement de *P. violaceum*.

Lorsque l'on associe *Polysphondylium violaceum* avec *B. violaceus*, il donne une culture très luxuriante. Les appareils sporifères formés sont incolores. (J'aurai l'occasion de revenir sur l'importance de cette constatation.) En outre, dans les cultures, ce sont seulement les jeunes myxamibes qui se colorent.

En résumé, le pigment des Bactéries chromogènes permet de révéler *in vivo* la structure des myxamibes des Acrasiées. La violacéine surtout constitue un colorant vital d'une extrême délicatesse. Non seulement elle nous montre la structure réticulée de l'endoplasme, mais elle colore aussi le karyosome à l'état de repos ou à l'état de division.

Nous allons voir maintenant que la coloration de l'appareil de fructification par le pigment des Bactéries n'est pas indifférente au point de vue taxinomique et que certaines espèces d'Acrasiées, décrites comme distinctes à cause de leur couleur, devront sans doute être considérées comme appartenant à une même espèce associée à des Bactéries chromogènes différentes.

IMPORTANCE TAXINOMIQUE DES PIGMENTS BACTÉRIENS CHEZ LES ACRASIÉES

Mon attention a été attirée sur l'importance que pouvaient présenter les pigments bactériens dans la systématique des Myxomycètes par les changements de couleur que l'on observe dans les appareils de *D. mucoroides* suivant le milieu de culture et suivant la Bactérie associée. Tous les auteurs qui ont étudié cette Acrasiée notent ce fait que sa fructification incolore, lorsqu'elle est jeune, devient jaunâtre en vieillissant.

Cultivons *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* dans un milieu

liquide où *B. fluorescens* donne son pigment. Le milieu minéral de Gessard convient particulièrement; les têtes des jeunes fructifications de *D. mucoroides* nous montreront alors une belle fluorescence. Il en est de même si nous faisons la culture pure mixte sur carottes lavées à l'eau ammoniacale avant la stérilisation.

On sait que le pigment fluorescent ne se montre que dans les milieux alcalins. Soumettons aux vapeurs d'ammoniaque des têtes de jeunes fructifications *D. mucoroides* avec *B. fluorescens* qui sont incolores : très fréquemment, nous les verrons prendre une magnifique fluorescence. Or, le pigment fluorescent se transforme en pigment couleur jaune feuille morte.

C'est précisément ce qui a lieu dans les vieilles fructifications de *D. mucoroides* et ce qui leur donne leur couleur.

Mettons en culture pure mixte *D. mucoroides* avec *Bacillus coli* : les fructifications resteront toujours d'un blanc parfaitement pur. Aussi y a-t-il lieu de se demander si *Dictyostelium lacteum* Van Tieghem n'est pas une association de *D. mucoroides* avec une Bactérie sans pigment. Dans les milieux de culture qui conviennent peu, il arrive souvent, en effet, que, comme chez *D. lacteum*, l'on a des fructifications de *D. mucoroides* dont le pied est formé d'une seule rangée de cellules et dont les spores plus petites sont presque sphériques, mesurant de 3 à 5 μ de diamètre. Il est permis aussi de faire des réserves pour le *Dictyostelium roseum* Van Tieghem qui, à part sa couleur, ne se différencie pas beaucoup de *D. mucoroides*, pour *Dictyostelium aureum* Olive, surtout pour *Guttulina rosea* Cienkowski, dont Cienkowski a noté la coloration des myxamibes. Il n'y a certainement aucun doute pour *Guttulinopsis vulgaris* Olive; voici en effet ce qu'en dit l'auteur :

« La couleur de la tête sporifère peut varier avec la sécheresse et la composition du substratum. Quand elle pousse sur du crottin, par exemple, les têtes sont ordinairement blanches; puis, plus tard, en séchant, elles deviennent uniformément jaunâtres; au contraire, sur tubes de gélose les têtes sporifères sont uniformément blanches. Il est possible que la couleur jaunâtre soit due à de petites particules, provenant du substratum, qui sont transportées dans l'ascension de la colonie et dont la couleur se voit davantage par suite de la dessiccation. »

Ici, il s'agit évidemment d'une association de l'Acrasiée avec une Bactérie fluorescente comme pour *D. mucoroides*. Peut-être pourrait-on en dire autant de *Guttulina aurea* Van Tieghem, dont Van Tieghem dit qu'elle ne diffère de *Guttulina rosea* que par sa couleur.

Les deux Acrasiées à pigment violet que j'ai étudiées, *Dictyostelium purpureum* et *Polysphondylium violaceum* ont un pigment propre. En effet, elles conservent ce pigment sur les milieux de culture divers que j'ai essayés; en outre, quelle que soit l'espèce de Bactérie fluorescente ou de Bactérie non chromogène associée, s'il y a quelques différences dans la longueur du pied, la grosseur de la tête sporifère, dans l'abondance des ramifications, au contraire les caractères essentiels, la couleur, les dimensions des spores, restent constants.

Associé avec une Bactérie chromogène, *B. violaceus*, *D. purpureum* donne des fructifications colorées mais très petites. Au lieu d'une tête sporifère ayant souvent plus de 300 μ , la tête ne mesure pas plus de 60 à 80 μ . Le pied n'a pas plus de 2 à 5 m.m. de hauteur, au lieu de souvent plus d'un centimètre.

Avec la même association bactérienne, la transformation de *Polysphondylium violaceum* est encore plus grande.

Les fructifications très abondantes, souvent très ramifiées, portent des têtes sporifères très petites, certaines peuvent être inférieures à 50 μ . Enfin elles sont complètement incolores. Ces caractères se conservent dans les cultures successives à condition que la Bactérie donne son pigment. Dans de telles cultures, les caractères de l'Acrasiée sont très voisins de ceux de *Polysphondylium pallidum* Olive.

Comment expliquer ce phénomène de décoloration?

Tout d'abord établissons ceci : c'est que le pigment de la Bactérie et celui du Champignon sont différents. En effet les réactions aux bases et aux acides sont différentes.

Le pigment de la Bactérie est soluble dans l'alcool en donnant une solution d'un beau violet. L'ammoniaque, la potasse font virer la couleur en vert. L'acide acétique rend la teinte plus bleue.

Le pigment de l'Acrasiée paraît être énergiquement fixé. Il n'est soluble ni dans l'eau, ni dans l'alcool, ni dans l'éther, ni dans le chloroforme. Sous l'action des alcalis, il devient plus bleu; au contraire il vire au rouge avec l'acide acétique.

Le pigment bactérien, d'après Bourquelot, serait dû à l'action d'un ferment oxydant sur un phénol.

Devons-nous admettre qu'il en est de même pour l'Acrasiée et que dans le cas de *Polysphondylium violaceum* qui est toujours moins coloré que *D. purpureum*, la production d'oxydase est plus fugitive et que cette oxydase est fixée par le pigment bactérien ?

OBSERVATIONS SUR LA CYTOLOGIE DES MYXAMIBES ET LA FORMATION DE L'APPAREIL SPORIFIÈRE

Comme, assez fréquemment, on observe, chez les myxamibes des Acrasiées que j'ai étudiées, des vacuoles qui ne contiennent qu'une seule Bactérie, certains auteurs ont pris souvent les Bactéries incluses dans les vacuoles pour des corps chromatiques. Olive qui a fait un travail consciencieux sur le sujet trouve qu'il est souvent difficile de se prononcer.

Si l'on veut étudier la cytologie de ces organismes, il est nécessaire de faire, aux mêmes stades de développement, d'une part des préparations colorées par la thionine par exemple, permettant de bien voir les Bactéries, et d'autre part des préparations faites avec les méthodes de coloration spéciales pour mettre en évidence les corps chromatiques.

La méthode de coloration de Laveran, déjà indiquée, donne sur les préparations réussies tous les détails de la structure cellulaire des myxamibes.

J'ai cependant contrôlé ces résultats par deux autres méthodes : 1^o coloration à l'hématoxyline au fer d'Heidenhain après fixation au sublimé : 2^o méthode de Borrel : coloration au rouge de Magenta, différenciation par le picro-indigo-carmin, alcool, essence de girofle, sur des préparations fixées avec le liquide suivant :

Eau.....	300 grammes,
Acide acétique.....	20 —
Acide osmique.....	2 —
Chlorure de platine.....	2 —
Acide chromique.....	3 —

Pour la période qui comprend la vie végétative des myxamibes on peut se contenter de préparations sur lames ; mais pour la période de fructification, il est préférable de fixer, puis

d'inclure dans la paraffine la culture elle-même avec son substratum. La gélose s'inclut très bien dans la paraffine à condition de ne pas la laisser plus d'une heure dans le xylol et de ne pas inclure à une température supérieure à 49°.

Dans la spore, lorsqu'elle est prête à germer, on peut colorer un corpuscule chromatique central entouré d'une zone périphérique claire. La membrane enveloppante est plus ou moins apparente. (Pl. II, fig. 1, 2, 3, 18, 11.)

Généralement si la culture est faite en gouttes pendantes, en milieu liquide par conséquent, lorsque la spore a germé, alors que la membrane est même encore adhérente à l'amibe qui conserve la forme de la spore, le noyau n'est plus colorable, et il semble, comme l'a vu Olive, qu'il se soit réduit en corpuscules chromatiques qui sont disséminés dans le protoplasme. (Pl. II, fig. 3, 4.) Ces corpuscules se disposent parfois de manière à constituer une spirale. (Pl. II, fig. 5.)

Ensuite tous ces corpuscules se rassemblent au centre de l'amibe quiescente, formant une sorte de plaque équatoriale. (Pl. II, fig. 6.)

Puis l'amibe prend une forme plus ou moins irrégulière et en même temps la masse chromatique équatoriale se divise en deux petites masses qui s'éloignent l'une de l'autre, séparées par une zone claire. (Pl. II, fig. 7, 8.)

La forme de ces masses est celle d'un bâtonnet un peu trapu. La vacuole devient alors plus nette; les deux bâtonnets, que nous pouvons assimiler à deux chromosomes, vont s'éloigner de plus en plus l'un de l'autre jusqu'à venir se coller aux deux extrémités de la vacuole qui pendant ce temps s'est allongée. (Pl. II, fig. 16, 17.) Les deux chromosomes s'incurvent en forme de toit. (Pl. II, fig. 18, 19.) L'amibe elle-même prend une forme plus longue; elle se scinde par étirement (Pl. II, fig. 20, 24, 25), chacune des parties emportant la moitié de la vacuole qui s'est divisée. Chaque amibe fille contient alors une vacuole avec 2 chromosomes, les chromosomes s'étant coupés au niveau du sommet du toit.

Sur les milieux solides on observe rarement le stade de fragmentation du noyau et le stade de la plaque équatoriale, lors de la germination de la spore.

L'amibe qui sort de la spore prend presque immédiatement

une forme irrégulière. (Pl. II, fig. 14, 15, 21, 22, 23.) Le karyosome central se divise en deux chromosomes qui se placent parallèlement l'un à l'autre et tout se passe comme plus haut. Ceci se voit nettement sur des préparations à l'hématoxyline au fer. (Pl. I, fig. 2 et 3.)

Les amibes vont grossir, devenir plus ou moins vacuolaires et se diviseront de nouveau un plus ou moins grand nombre de fois, le mode de division étant toujours le même.

Il s'agit en somme d'une division indirecte très simplifiée. Il n'y a ni centrosomes, ni filaments de linine.

Dans les cultures, vers la 40^e heure, au moment où la vie des myxamibes est la plus active, on observe souvent une division directe du noyau. (Pl. II, fig. 28, 29, 30, 31.) Le noyau se divise alors par étirement. (Pl. III, fig. 4, 5, 6, 7.) A ce stade on rencontrera parfois des myxamibes possédant deux noyaux.

Si l'on étudie la formation de l'appareil sporifère sur des coupes, on voit que la différenciation des cellules du pied se fait à l'intérieur de la masse formée par les myxamibes agrégées, réunies entre elles par du mucus. Elle procède du centre vers la périphérie et de la base au sommet. Ceci est très net sur des coupes faites les unes parallèlement, les autres perpendiculairement à l'axe de la masse fructifiante. Dans la planche IV, fig. 1, sur une coupe sagittale d'un appareil sporifère tout à fait au début de sa formation, on voit que les cellules les premières différenciées pour former le pied sont les myxamibes centrales (C); ces cellules, par suite du glissement des myxamibes sous-jacentes, formeront la base du pied qui continuera à s'accroître en hauteur et en largeur, par différenciation des myxamibes occupant le centre de la masse. (Pl. IV, fig. 2 et 4.)

Avec le réactif de Mangin, acide iodhydrique fumant iodé, on distingue de très bonne heure sur coupes les cellules différenciées pour former le pied; elles sont en effet entourées d'un liséré bleu violet qui va en augmentant, indiquant une membrane cellulosique. Le même réactif colore en bleu violet la membrane des spores, sur de semblables coupes.

On se rend compte aussi que la masse en fructification s'élève à chaque fois d'une hauteur égale à la longueur de pied construite. Or si nous considérons que les cellules qui forment le pied

deviennent vacuolaires, se gorgent d'un liquide hyalin et que par suite leur volume augmente, nous concluons à l'existence d'une pression à l'intérieur de la masse. Le glissement des myxamibes se trouve donc aidé par un soulèvement. Le pied, en se formant, fait l'office de piston. Cela nous permet de comprendre la rapidité avec laquelle s'édifie parfois un appareil sporifère.

L'existence de cette pression explique aussi la forme spirale que présentent les jeunes appareils sporifères en s'élevant. La tension oblige le pied (P) à se courber et sa courbure entraîne celle de la masse des myxamibes, comme le montre bien la photographie d'une coupe sagittale d'un appareil sporifère en voie de formation. (Pl. IV, fig. 3.) La pression qui résulte de la formation du pied peut aussi nous expliquer les formes ramifiées que l'on observe quelquefois chez les *Dictyostelium* et toujours chez les *Polysphondylium*. En effet, si la cohésion de la masse formée par les amibes est moindre ou si la pression intérieure est plus forte, il y aura fragmentation de la masse. Les petites masses étagées ensuite par suite de l'accroissement intercalaire du pied se comportent comme autant de colonies distinctes. Les ramifications ainsi formées sont presque perpendiculaires sur l'axe principal parce que, comme nous l'avons vu, les appareils sporifères se forment toujours perpendiculairement au substratum.

III

RECHERCHES SUR LES MYXOMYCÈTES ENDOSPORÉS

Dans la nature, les Myxomycètes endosporés se rencontrent le plus souvent sur les feuilles mortes, la mousse, les branches de bois mort et sur les vieux troncs d'arbres pourris.

Rien n'est plus facile que d'en avoir des cultures au laboratoire, en y transportant les fragments de bois ou les feuilles mortes qui les portent. Ces matériaux sont mis dans des assiettes que l'on recouvre d'une cloche. Il suffit de les arroser dès le début. On soulève ensuite de temps en temps la cloche de manière à maintenir un état d'humidité et d'aération convenable. J'ai pu obtenir ainsi sur les mêmes fragments de bois, pendant plusieurs années consécutives, des cultures d'*Arceyria ferruginea*,

de *Trichia varia*, de *Comatricha obtusata* et de *Stemonitis fusca*.

Ce sont des procédés de cultures analogues qu'ont employé la plupart des savants, Cienkowski, Rostafinsky, de Bary, Lister, qui ont étudié le développement de ces Myxomycètes.

Je rappellerai brièvement les essais de culture en milieu plus ou moins artificiel que quelques auteurs ont réalisés.

Cienkowski (6) a obtenu les plasmodes de *Licea pannorum* (*Perichæna populina* Fries) en ensemençant les spores sur des carottes pourries. Il a cultivé *Didymium libertianum* (*Didymium difforme* Duby) dans l'eau.

Ward (35) étudie en gouttes pendantes, dans une décoction de jacinthes, un Myxomycète qu'il ne détermine pas (il s'agit probablement du *Didymium difforme*) et qu'il avait trouvé sur des racines de jacinthes cultivées dans de l'eau contenant un peu de sel de chaux, de magnésie, de potasse et de soude. La chambre humide était aseptisée au préalable et il obtenait ainsi une culture ne renfermant exclusivement que des Bactéries.

Stahl et, après lui, Strasburger (31) emploient pour le *Chondrioderma difforme* (*Didymium difforme*) un milieu analogue à celui de Ward. Ilsensemencent les spores dans une décoction de tiges de Fève; puis ils font plonger dans cette décoction des tiges du même végétal, et sur celles-ci ils voient se former les plasmodes et les appareils sporifères. Enscli (9) a répété les expériences de ces auteurs et fait remarquer qu'il est curieux de voir que les plasmodes se forment uniquement sur les tiges de Fève et non sur les parois du récipient. Cela tiendrait à ce que la tige de Fève laisse diffuser dans le liquide de culture une substance chimique exerçant sur les amibes une influence chimiotaxique. Toutes les amibes sont attirées vers la tige de Fève et l'on comprend que les plasmodes ne puissent se former que là.

Dans un travail fait au laboratoire de Pfeffer, Stange (30 bis) avait déjà montré que les myxamibes de *Chondrioderma* étaient attirées dans des tubes capillaires contenant de l'extrait de Fève. Toutes les cultures de ces auteurs sont très impures. Les Bactéries, les Flagellates, les Amibes y pullulent.

Comme Ward, Miller (19) obtient des cultures où les seules impuretés sont des Bactéries. Il cultive ainsi *Physarum cinereum*, un *Stemonitis*, *Chondrioderma* (*Didymium*) *difforme*, *Didymium microcarpon* (*Didymium nigripes* Fries). Son milieu de culture con-

siste en une solution de foin ou d'eau additionnée de 2 0/0 de lait. Il y fait plonger des brindilles de foin et le tout est stérilisé.

Dans un travail récent, Constantineanu (8) dit avoir pu réussir des cultures de Myxomycètes dans les solutions suivantes : Knop 1 0/0, dextrine 1 0/0, glucose 2, 5 0/0, ou bien Knop 1 0/0, dextrine 5 0/0. Il a soit seulement les plasmodes, soit quelquefois aussi les appareils de fructification d'*Ethalium septicum*, *Physarum didermoides*, *Didymium effusum*, *Badhamia macrocarpa*, *Leocarpus vernicosus*, *Amaurochaete atra*, *Chondrioderma reticulatum*.

Dans son étude, Contanstineanu ne s'est occupé ni de la pureté de ses cultures, ni du rôle que les Bactéries pouvaient y jouer en modifiant la composition du milieu.

Peut-on obtenir une culture pure de Myxomycètes endosporés ?

Il faut pour cela avoir des spores pures¹. Jusqu'ici je n'ai pu y réussir. Je n'ai pu y réussir pour deux raisons :

1° Parce que l'intérieur des sporanges de Myxomycètes est rempli d'impuretés (Bactéries, spores de Champignons, kystes de Protozoaires) ;

2° Parce que les spores des Myxomycètes endosporés ne résistent pas à un chauffage un peu élevé en milieu humide. Comme elles sont accompagnées de Bactéries sporulées, l'éther et le chloroforme ne peuvent donner aucun résultat.

Pour donner une idée de la quantité d'impuretés contenue dans un sporange de Myxomycète, je vais exposer le résultat d'une numération des germes uniquement bactériens contenus d'une part dans un sporange jeune, d'autre part dans un sporange mûr de *Trichia varia*, développé sur bois dans une assiette sous cloche.

Le sporange jeune est prélevé à l'aide de pinces flambées. Puis, la calotte supérieure est enlevée à l'aide de l'extrémité d'une pipette chauffée au rouge. Avec une autre pipette, il est facile de vider le sporange de son contenu. Le contenu étant dilué dans l'eau ordinaire stérile, on fait une numération approximative des germes par ensemencement dans la gélatine répartie dans des boîtes de Pétri. Sans tenir compte des germes

1. J'entends par spores pures, des spores qui, mises dans un tube de bouillon laisseront ce bouillon indéfiniment stérile.

aptes à se rajeunir, nous trouvons 200 colonies pour un sporange qui n'a certainement pas 2 millimètres cubes de capacité.

Les germes les plus fréquents sont les *Bacillus fluorescens* var. *liquefaciens* et var. *putridus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus luteus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus violaceus*, *Sarcina aurantiaca*.

Pour le sporange mûr, le nombre obtenu a été plus fort, 375 colonies, mais il faut tenir compte de la manière d'opérer qui est différente et qui introduit une cause d'erreur. En effet, on est forcé de faire éclater le sporange avec une pointe flambée au-dessus d'une boîte Pétri stérile, puis de reprendre par l'eau le contenu de la boîte Pétri; or, forcément, il y a un peu de débris de membrane qui amènent des germes étrangers.

Ne pouvant avoir des spores pures, ne pouvant par conséquent avoir recours immédiatement à la méthode synthétique, j'ai procédé par analyse.

Un sporange de *Didymium difforme* est prélevé aseptiquement et mis dans une boîte de Pétri stérile. On le fait éclater avec une pointe flambée. Les spores ainsi disséminées sont recueillies peu à peu à l'aide d'une spatule stérile trempée dans de l'eau stérilisée et réparties à la surface d'une gélose nutritive, dans un grand nombre de tubes.

Cette gélose est préparée de la manière suivante :

20 grammes de gélose sont mis à laver dans un courant d'eau pendant 24 heures. Puis on les rince à plusieurs reprises dans l'eau distillée. Enfin on les met dans un litre d'eau, dans lequel on ajoute 20 grammes de bois pourri. Le tout chauffé à 115° est réparti après filtration dans les vases de culture et l'on stérilise par chauffage à 114° pendant 1/4 d'heure.

Les tubesensemencés sont laissés à la température du laboratoire. Un petit nombre de tubes, examinés après quelques jours, ne montrent aucune culture ni de Bactéries, ni du Myxomycète. Le plus grand nombre montre dès le début des cultures très variées de Bactéries, d'Amibes, de Flagellates. Enfin d'autres, d'aspect beaucoup plus pur, montrent des zoospores dans l'eau de condensation. Sur ceux-ci, on ne tarde pas à voir paraître des plasmodes, puis des appareils sporifères.

Le développement de *Didymium difforme* peut être très rapide et s'effectuer en moins de 4 jours.

C'est parmi ces tubes que j'ai pu trouver *Didymium difforme*

en culture pure mixte avec une Bactérie. Cette Bactérie isolée et ajoutée aux tubes qui, contenant des spores de *Didymium difforme*, étaient restés stériles a permis le développement complet de *Didymium difforme*.

Cette Bactérie a la forme d'un bâtonnet d'une longueur de 2 à 3 μ et d'une largeur de 1 μ environ. Elle est immobile et prend le Gram. On y observe la formation des spores tantôt au milieu, tantôt près de l'une des extrémités.

Les colonies sur plaques de gélatine sont nummulaires, d'un beau jaune; elles ne liquéfient pas la gélatine. Le bouillon se trouble et il y a formation d'un voile à la surface.

Sur gélose la strie d'ensemencement est plus ou moins épaisse, jaune, luisante avec des rugosités.

D'après ces caractères, cette bactérie se rapproche de *Bacillus luteus* Flügge.

En ajoutant cette même Bactérie à des tubes de gélose de bois contenant des spores de *Didymium effusum* qui ne s'étaient pas développées, j'ai réussi à produire l'évolution complète de ce Myxomycète.

Des essais, faits avec quelques autres Bactéries (*B. fluorescens*, *B. coli*), ne m'ont donné aucun résultat. D'où j'ai conclu que si cette Bactérie n'est pas absolument nécessaire (certaines Bactéries peuvent peut-être jouer le même rôle), du moins elle est très favorable.

En résumé, tandis que jusqu'ici on n'avait eu que des cultures très impures, je suis arrivé à cultiver deux espèces de Myxomycètes endosporés avec une seule Bactérie, montrant ainsi que l'on peut comme pour les Amibes, comme pour les Myxomycètes acrasiiées, avoir des cultures pures mixtes de Myxomycètes endosporés.

OBSERVATIONS SUR LES CULTURES DE *Didymium difforme* ET DE *Didymium diffusum*.

Lorsque les colonies bactériennes sont séparées à la surface du milieu, on remarque que les plasmodes se forment toujours au niveau des colonies bactériennes. Peut-être faudrait-il chercher là l'explication du fait que dans les expériences de Stahl, d'Ensch, les plasmodes se forment seulement sur les

tiges de Fève. En effet, alors que le milieu liquide est épuisé, n'est plus convenable pour la culture des Bactéries qui s'y trouvent, la tige de Fève offre aux Bactéries un bon milieu de culture et par suite attire les myxamibes.

Lorsque les plasmodes vont fructifier, ils fuient les colonies bactériennes et l'humidité.

Pourtant si l'on fait la culture en milieu liquide, en vase d'Erlenmeyer selon la méthode de Miller, on voit qu'avant de fructifier, le plasmode qui est sorti du liquide se nourrit encore par osmose durant quelque temps.

Il laisse quelques fins prolongements plonger dans le liquide. Puis, à un moment, ces prolongements se rétractent eux-mêmes, le plasmode se rassemble en plusieurs petites masses qui se transforment en sporanges.

Il arrive assez fréquemment soit que le substratum soit trop sec, soit que la gélose soit couverte de Bactéries, de voir *Didymium effusum* former son appareil sporifère dans l'eau de condensation. Dans ces conditions le pied avorte, le capillitium est très réduit ; les spores sont mêlées d'éléments arrondis beaucoup plus gros dont la membrane sans ornements est plus épaisse et ne présente pas la réaction de la cellulose ; ce sont de véritables kystes.

Il n'est pas rare d'observer l'existence de kystes semblables dans les sporanges de nombreux Myxomycètes.

Je les ai constatés dans des sporanges de *Leocarpus vernicosus*, d'*Arcyria ferruginea*, de *Trichia varia*.

Il faut sans doute attribuer à la présence ou à l'absence de ces kystes les opinions contradictoires des auteurs relatives à la durée de la vitalité des spores.

On ne doit pas oublier que chez les Myxomycètes les kystes sont les véritables formes de résistance tandis que les spores ne sont que des organes de dissémination.

J'ai eu des plasmodes de *Didymium effusum* par l'ensemencement de kystes datant de cinq ans.

Les kystes supportent très bien l'action des solutions alcalines concentrées. J'avais vu là un moyen de purification des Myxomycètes. Seulement les plasmodes obtenus, quoique associés avec *Bacillus luteus*, n'ont jamais donné d'appareils de fructification.

La même chose s'est produite dans mes cultures pures mixtes successives de *Didymium difforme* et de *Didymium effusum*. Après plusieurs ensemencements fructueux, le milieu et les conditions extérieures étant les mêmes, il n'y a plus eu dans les cultures que production de plasmodes qui se transformaient en sclérotés (amas de kystes).

Il y a lieu par suite de se demander si, pour la fructification, il n'est pas nécessaire qu'il y ait une conjugaison préalable de plasmodes de signes différents (+ et —), de même qu'il faut deux thalles différents, chez certaines Mucorinées, d'après les recherches de Blakeslee pour la production de l'œuf. Dans cette hypothèse, il n'y aurait plus eu dans mes cultures que des plasmodes de même signe.

Ensch a fait sur *Didymium difforme* l'observation suivante : les spores qui germent sur milieu solide donnent directement une myxamibe.

J'ai pu vérifier ce fait et voir qu'il en est de même pour *Didymium effusum*. La zoospore ne se produit qu'en milieu liquide.

Dans les mêmes conditions, sur milieu solide, j'ai observé la germination des spores de *Spumaria alba*. La masse protoplasmique et le noyau des spores se divisent en deux, en quatre, puis en huit, et on a huit myxamibes.

IV

RECHERCHES SUR LE *PLASMODIOPHORA BRASSICÆ*

Depuis le travail classique où Woronin montrait que la « hernie » du Chou est due à l'introduction d'un parasite, le *Plasmodiophora brassicæ*, dans les cellules de la racine du végétal, ce Myxomycète a été l'objet de nombreux travaux cytologiques dont les plus complets sont ceux de Nawaschin et de Prowazek; même quelques auteurs, comme Podwyssotzki ont voulu voir une certaine relation entre lui et le cancer de l'homme.

Sa biologie au contraire a été peu étudiée et cependant c'est son étude biologique qui seule pourria permettre de trouver le moyen de le combattre avec efficacité. Car ce parasite occasionne des pertes considérables et une fois qu'il a envahi une culture de Choux, il n'y a pas d'autres remèdes que d'abandonner cette culture.

Les recherches que j'ai précédemment exposées sur les Myxomycètes endosporés et acrasisés, m'ont amené à rechercher si les Bactéries ne jouaient pas un rôle dans le développement de ce parasite.

En souillant avec des spores de *Plasmodiophora brassicae* la terre contenue dans des pots où j'avais ensemencé des graines de *Brassica oleracea*, j'ai reproduit l'infection expérimentale.

Les petites tumeurs produites sur les racines des jeunes plants furent fixées dans le liquide de Flemming-Borrel, dont la composition a été indiquée plus haut, et incluses dans la paraffine. Les coupes ont été colorées de la manière suivante d'après une méthode de Borrel :

Mordantage au tannin à 1 0/0 pendant 1/2 heure; surcoloration à la thionine, puis différenciation par la même solution de tannin.

Cette méthode (Planche III, fig. 8.) colore très bien le parasite et ses noyaux sont bien visibles, formés d'un karyosome (K) central entouré d'une zone claire limitée par une membrane et plongés au milieu d'un protoplasme granuleux contenant de nombreuses gouttelettes d'huile colorées en noir par l'acide osmique. En outre dans les cellules envahies par le parasite et dont le noyau (N) présente toujours une hypertrophie du nucléole (n), on distingue au milieu des granulations protoplasmiques et de leucites, de petits amas (B) morphologiquement semblables à des amas de Bactéries. Ils sont très fortement colorés et sont constitués par des formes soit *coccus* soit *bacille*, isolées ou bien associées par deux.

L'observation microscopique ne pouvait donner qu'une indication et on ne pouvait conclure avec certitude que les zoospores du parasite en pénétrant dans les racines de la plante y avaient introduit des Bactéries. Il était nécessaire de le démontrer par la méthode des cultures.

Mes premières recherches furent faites avec les petites tumeurs que j'avais à ma disposition. Je fis des prélèvements aseptiques dans un grand nombre d'entre elles en brûlant la surface avec un fer rougi et puisant dans l'intérieur avec une pipette stérile. L'ensemencement du contenu de la pipette dans du bouillon donna toujours lieu à une culture bactérienne.

Mais étant donné le peu de volume des tumeurs, je ne pou-

vais brûler très profondément; il pouvait y avoir là une cause d'erreur.

J'ai eu alors un matériel de choix dans des tumeurs, grosses comme le poing, formées sur *Brassica sinensis*¹. Ces tumeurs ne présentent aucune trace de pourriture; sur la coupe, elles sont d'une blancheur magnifique.

La surface d'une de ces tumeurs est, comme précédemment, brûlée profondément en un point avec un fer rouge et des prélèvements aseptiques sont opérés au moyen de pipettes flambées.

Les prises ainsi faites contiennent un grand nombre de spores du parasite. Ensemencées en bouillon, sur gélatine, sur gélose, elles donnent lieu à un abondant développement de Bactéries. Dans les cultures bactériennes ainsi obtenues, on rencontre presque toujours des Bactéries fluorescentes.

Ainsi en s'introduisant dans la racine du Chou, le parasite y introduit des Bactéries. Quel rôle jouent-elles?

Pour étudier ce point particulier, il était nécessaire de faire des cultures du parasite, de pouvoir suivre en tube le développement de *Plasmodiophora brassicæ*.

J'ai pu réussir à obtenir le développement expérimental du *Plasmodiophora brassicæ*, en employant la même technique dont Matruchot et Molliard (16) s'étaient servis pour la culture du *Phytophthora infestans*. Ces auteurs ont en effet cultivé le Champignon de la maladie de la Pomme de terre en l'ensemencant sur des fragments prélevés aseptiquement dans l'intérieur d'une pomme de terre à l'aide d'un emporte-pièce stérile. De même, je me suis servi de l'emporte-pièce que Borrel a fait construire pour prélever aseptiquement des morceaux de tissu cancéreux; l'instrument était stérilisé au four à flamber, la surface de jeunes navets était profondément brûlée au brûle-peau. On pouvait ainsi prélever aseptiquement des fragments que l'on mettait dans des tubes flambés. Ces tubes étaient ensemencés avec des spores prélevées elles-mêmes aseptiquement, comme plus haut, à l'intérieur des tumeurs. Ils étaient fermés à la lampe et placés à l'étuve à 22°.

Il se produit dès les premiers jours une culture discrète de

1. Ces tumeurs m'avaient été obligeamment fournies par M. le professeur Mangin.

Bactéries aérobies, culture bientôt arrêtée par suite de l'épuisement de l'oxygène. Cinq jours déjà après l'ensemencement, on trouve à l'intérieur des cellules du fragment de navet, le *Plasmodiophora* à divers stades, plusieurs cellules sont même bourrées de spores.

Répétons la même expérience en tubes ouverts, en tubes simplement bouchés au coton : les Bactéries aérobies qui accompagnent les spores pullulent et amènent la pourriture du navet.

J'ai avantageusement modifié la technique que je viens d'exposer par l'emploi de l'huile de vaseline. En effet, il arrive souvent que les spores sont souillées, non seulement de Bactéries aérobies, mais aussi de Bactéries anaérobies ; dans ce cas, les gaz produits par la fermentation arrêtent l'évolution du Myxomycète et en même temps le tube est transformé en une bombe dangereuse. On évite de fermer le tube, en mettant de l'huile de vaseline stérilisée dans les tubes, de manière à recouvrir complètement les fragments de navets.

Ainsi, de même que, d'après les recherches de Matruchot et Molliard, la pourriture dans la maladie de la Pomme de terre est causée par les Bactéries introduites par le Champignon (dans les cultures pures du *Phytophthora infestans* sur la Pomme de terre, on ne constate en effet jamais de pourriture), de même la pourriture de la hernie du Chou est due aux Bactéries introduites dans la racine par le parasite. Ces Bactéries se mettent à pulluler quand les conditions extérieures sont favorables et on sait que ces conditions sont un terrain humide, la pluie. Tout le tissu des racines se détruit et il n'en reste absolument que la partie fibreuse.

On peut voir ici une véritable symbiose entre le Myxomycète et les Bactéries.

Le Myxomycète entraîne les Bactéries avec lui, et les amène dans un milieu qui leur deviendra extrêmement favorable ; de leur côté les Bactéries en détruisant la racine du Chou mettront en liberté les spores du parasite qui sont incluses dans les cellules.

En outre il semble que les Bactéries soient nécessaires à la vie extracellulaire du parasite.

En effet, des spores ayant été ensemencées sur un grand nombre de tubes de gélose à l'eau, la plupart de ces tubes contenant des Bactéries ont donné lieu à un début de développement : j'ai pu y observer la formation de zoospores, puis d'amibes extrêmement petites qui s'arrondissent et ont alors un diamètre de 3 à 4 μ . Ces amibes périssent le plus souvent, mais, parfois, elles s'entourent d'une membrane qui ne présente pas la réaction de la cellulose et qui se colore en jaune par l'iode. Avec ces petits kystes, j'ai reproduit l'infection expérimentale et les cultures.

Je n'ai pas constaté l'évolution des spores dans les tubes où il n'y avait pas de culture bactérienne.

CONCLUSIONS

1^o Par l'étude de trois espèces d'Acrasiées, de deux Myxomycètes endopores et enfin d'une espèce parasite, je crois avoir établi la grande importance que peut prendre l'association des Bactéries dans le groupe des Myxomycètes. Que certains Myxomycètes puissent vivre avec d'autres microbes ou même se nourrir uniquement par osmose, c'est à démontrer.

2^o Dans la nature, les spores de Myxomycètes ne sont jamais pures, qu'elles soient contenues dans du mucus comme chez les Acrasiées, dans un sporange comme chez les Endosporées, dans une cellule de la racine d'un végétal comme chez une espèce parasite, *Plasmodiophora brassicæ*. Jusqu'ici on ne connaît pas de Myxomycète capable de vivre en culture pure. Mais il est possible d'avoir des cultures dites *cultures pures mixtes*, où le Myxomycète est en association avec une seule Bactérie.

3^o J'ai réalisé la culture pure mixte de trois Acrasiées, *Dictyostelium mucoroides*, *Dictyostelium purpureum*, et *Polysphondylium violaceum* avec diverses Bactéries.

4^o Ces Myxomycètes sont parasites des colonies bactériennes. Leurs myxamibes ingèrent les Bactéries et les digèrent dans leurs vacuoles à l'aide d'une diastase voisine de l'amibodiastase.

5^o J'ai montré l'importance taxinomique que peuvent prendre les pigments des Bactéries chromogènes associées. J'ai fait en

même temps quelques recherches sur la coloration vitale des myxamibes par les pigments bactériens.

6° J'ai ajouté des observations sur la cytologie et le développement de l'appareil sporifère des Acrasiées étudiées.

7° J'ai réalisé la culture pure mixte avec *Bacillus luteus* Flügge de *Didymium effusum* et de *Didymium difforme*, deux Myxomycètes endosporés; j'ai donné des remarques sur ces cultures.

8° Enfin, en étudiant le développement d'un Myxomycète parasite des racines des Crucifères, le *Plasmodiophora brassicae*, à l'aide de cultures faites *in vivo* et *in vitro*, j'ai mis en évidence le rôle que jouent les Bactéries introduites dans les racines par le Myxomycète. Ce sont elles qui amènent la pourriture lorsque les conditions extérieures deviennent favorables à leur pullulation. Ici, j'ai pu montrer qu'il s'agissait d'une vraie symbiose.

BIBLIOGRAPHIE

1. — DE BARY A. *Die Mycetozoen (Schleimpilze)*, Leipzig, 1864.
2. — BEYERINCK. Culturversuche mit Amöben auf festem Substrate. *Centralbl f. Bakt.* I. Abth. Bd XIX, 1896.
3. — BREFELD. *Dictyostelium mucoroides*, ein neuer Organismus aus Verwandtschaft der Myxomyceten. *Nat. gesellschaft.* Bd VII, 1869. — *Polysphondylium violaceum* und *Dictyostelium mucoroides* nebst Bemerkungen zur Systematik der Schleimpilze, *Unters. aus dem Gesamtgebiete der Mykologie.* Heft VI, 1884.
4. — CELAKOWSKI L. Ueber die aufnahme lebender und todter verdaulicher Körper in die Plasmodium der Myxomyceten, *Flora.* Bd LXXVI, 1892.
5. — CHRZASZCZ. *Physarum leucophœum*, eine hefe fressende Amöbe. *Centralbl f. Bakt.*, 1902, 2^e partie, t. VIII.
6. — CIENKOWSKI. Zur Entwicklungsgeschichte der Myxomyceten, *Jahrbücher für wiss. Botanik.* Bd III, 1863.
7. — CLATCHIE MC. Notes on germinating myxomycetous spores, *Botan. gazette*, t. XXX, 1894.
8. — CONSTANTINEANU. Ueber die Entwicklungsbedingungen der Myxomyceten, *Ann. myc.*, vol. IV, n° 6.
9. — ENSCH. Notes sur les Myxomycètes, *Trav. Laborat. Wimereux*, t. VII, 1899.
10. — FROSC. Zur Frage der Reinzüchtung der Amöben, *Centralbl f. Bakteriologie*, I Abth. Bd XXI, 1897.

11. — GRIMM. Ueber den Bau und die Entwicklungsgechichte von *Dictyostelium mucoroides* (d'après Potts).
12. — JAHN. Myxomycetenstudien; 4 Die Keimung der Sporen. *Bot. Ges.* t. XXIII, 1905.
13. — KRUKENBERG. Ueber die Enzyymbildung der Geweben und Gefässen. *Untersuch. d. phys. Institut. Heidelberg*, t. II, 1878.
14. — LISTER. Notes on the plasmodium of *Badhamia*, *Ann. of Botan.*, t. II, 1888; — Note on the Ingestion of food material by the swarmcells of Mycetozoa. *Journ. Lin. Soc. London*, t. XXV, 1890. — Mycetozoa. London, 1894.
15. — MATRUCHOT. Sur une structure particulière du protoplasma chez une Mucorinée et sur une propriété générale des pigments bactériens et fongiques, *Trav. Lab. Wimereux*, t. VII, 1899.
16. — MATRUCHOT et MOLLIARD. Culture du *Phytophthora infestans*. Lons-le-Saunier, 1901.
17. — MESNIL. Recherches sur la digestion intracellulaire et les diastases des Actinies, *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. XV, 1901.
18. — METCHNIKOFF. Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Paris, 1892. — Sur l'acide des Plasmodies. *Ann. de l'Inst. Past.*, t. III, 1889.
19. — MILLER. The aseptic cultivation of Mycetozoa. *Quarterly Journal of microscopical science*. Vol. XLI, 1899.
20. — MOUTON. Recherches sur la nutrition des Amibes et sur leur diastase intracellulaire, *Ann. de l'Institut. Pasteur*, t. XVI, 1902.
21. — NADSON. Des cultures de *Dictyostelium mucoroides* et des cultures des Amibes en général. *Script. botanica*, fasc. XV, Saint-Petersbourg, 1899.
22. — NAWASCHIN. Beobachtungen über der feineren Bau und umwandlungen von *Plasmodiophora brassicae* Woron. im Laufe ihres intracellularen Lebens, *Flora*, 1899, Bd. LXXXVI, 5 Heft.
23. — OLIVE. Monograph of the Acrasieae, *Proceedings of the Boston Society of Natural History*, vol. XXX, n° 6.
24. — PFEFFER. *Pflanzen physiologie*, I. Bd, Leipzig, 1897
25. — PINOY. Nécessité de la présence d'une Bactérie pour obtenir la culture de certains Myxomycètes, *Bull. Société mycol. de France*, t. XVIII, 3^e fascicule, 1902; — Nécessité d'une symbiose microbienne pour obtenir la culture des Myxomycètes, *C. R. Acad. des Sc.* t. CXXXVII, 1903; — Rôle des Bactéries dans le développement du *Plasmodiophora brassicae*, Myxomycète parasite produisant la hernie du Chou. *C. R. Soc. de Biologie*, t. LVIII, p. 1010, 1905.
26. — POTTS. Zur Physiologie des *Dictyostelium mucoroides*. *Flora*, Bd XCI, 1902.
27. — PRILLIEUX. *Maladies des plantes agricoles*, Paris, 1897, t. I, p. 40.
28. — PROWAZEK. Ueber den Erreger der Kohlhernie, *Plasmodiophora brassicae*, und die Einschlüsse in den Carcinomzellen. *Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte*, t. XXII, pp. 396-410, 1905.
29. — SCHROEDER. Ueber den Nachweis einiger Enzyme in den Fruchtkörper der Iohlblüte, *Beitrag. zur chem. Physiol. und Pathol.* IX Band 1906.
30. — STAHL. Zur logeiBioder Myxomyceten. *Botan Zeitung*, 1884, nos 10-12.

- 30 bis. — STANGE. Ueber chemotaktische Reizbewegungen. *Botan. Zeit.*, p. 107, 1890.
31. — STRASBURGER. *Das Botanische Practicum*, 1902, p. 474.
32. — TSUBITANI. Ueber die Reincultur der Amöben, *Centralbl. f. Bakt.* Bd XXIV, 1898.
33. — VAN TIEGHEM. Sur quelques Myxomycètes à plasmode agrégé, *Bull. Soc. Bot. de France*, t. XXVII, p. 317-322.
34. — VUILLEMIN. Une Acrasiée bactériophage. *C. R. Acad. des Sc.*, t. CXXXVII, 1903.
35. — WARD. The morphology and physiology of an aquatic myxomycete *Studies from the biological laboratories of the Owens college*, vol. I, 1886.
36. — WORONIN. Über die Krankheit der Kohlgewachse. *Jahrbücher f. Wissenschaft. Bot. herausgeg. von Pringsheim*, t. XI, 1878.
37. — ZAUBITZER. Studien über eine dem Strohinfus entnommene Amöbe. *Centralbl. f. Bakt.* I, Abth. Bd XXX, 1900.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE I

Fig. 1. — Photographie d'une culture de *Dictyostelium purpureum*. On voit que les appareils sporifères partent tous des colonies bactériennes et se dirigent vers le fond de la boîte, vers la lumière dont la direction est indiquée par la flèche.

Fig. 2. — *a*, myxamibe de *Dictyostelium mucoroides*; on voit son noyau. — Photographie d'une préparation colorée à l'hématoxyline au fer.

Fig. 3. — *a*, myxamibe de *D. mucoroides* dont le noyau s'est divisé.

b, myxamibe de *D. mucoroides* provenant d'une division; les deux chromosomes ne se sont pas encore séparés. Grossissement : 4200.

PLANCHE II

Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11. — Germination de la spore de *D. mucoroides*. Les grains chromatiques sont colorés en rouge. Coloration à la méthode Laveran.

Fig. 12. — Jeune myxamibe dont le noyau est en voie de division.

Fig. 13. — Jeune myxamibe se divisant.

Fig. 14. — Jeune myxamibe émettant des pseudopodes lobulés.

Fig. 15. — Jeune myxamibe à l'état de repos.

Fig. 16, 17. — Myxamibe dont le noyau s'est divisé.

Fig. 18. — Myxamibe dont les chromosomes se divisent.

Fig. 19. — Myxamibe après la division. Les deux chromosomes sont encore réunis.

20. — Myxamibes encore réunies.

Fig. 21, 22, 23. — Diverses formes de myxamibes.

Fig. 24, 25. — Formes de division.

Les figures 12 à 25 proviennent de préparations de *D. mucoroides* colorées à l'hématoxyline au fer.

Fig. 26, 27, 28, 29, 30. — Myxamibes d'une culture de 46 heures d'après des préparations colorées par la méthode Laveran. — On peut voir un grand nombre de Bactéries en voie de digestion à l'intérieur des vacuoles. N, noyau, B, Bactéries.

Tous les dessins sont faits au grossissement de 900.

PLANCHE III

Fig. 1 et 2. — Myxamibes de *Dictyostelium purpureum* d'une culture de 40 heures. Coloration méthode Borrel : rouge de Magenta, picro indigo carmin. On voit de nombreuses Bactéries dans les vacuoles. N. noyau, B. Bactéries.

Fig. 3. — Myxamibe de *Dictyostelium purpureum*. Coloration par la thionine. Le noyau N n'est pas distinct. Les Bactéries se voient bien dans les vacuoles.

Fig. 4, 5, 6, 7. — Myxamibes de *Polysphondylium violaceum*, culture de 40 heures. Coloration par la méthode Laveran.

Fig. 8. — Coupe d'une tumeur de racine de chou due au *Plasmodiophora brassicae*. N. noyau des cellules du parenchyme, n. nucléole, g. grains d'amidon, K noyaux du parasite. Les points noirs sont des granulations de graisse noircies par l'acide osmique. C, cellule envahie dont le noyau est en karyokinèse. B, Bactéries.

Tous les dessins sont faits au grossissement de 1000.

PLANCHE IV

Fig. 1. — Coupe sagittale d'un amas de myxamibes. Début de formation de l'appareil sporifère. C, masse d'amibes devenant claires et vacuolaires ; ébauche de la formation du pied. Grossissement : 75.

Fig. 2. — Coupe transversale d'une masse un peu plus âgée, le pied P s'est différencié. Grossissement : 150.

Fig. 3. — Coupe sagittale d'une masse de même âge montrant la torsion de la masse en même temps que celle du pied P. Grossissement : 50.

Fig. 4. — Coupe sagittale montrant le pied P formé au début de l'élévation de la masse sporifère. Grossissement : 50.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

ZOOLOGIE. — Les Flagellés.

GÉOLOGIE. — Les variations de facies des terrains crétacés dans
le bassin de Paris.

VU ET APPROUVÉ

Paris, le 13 mai 1907.

Le doyen de la Faculté des Sciences,

PAUL APPELL.

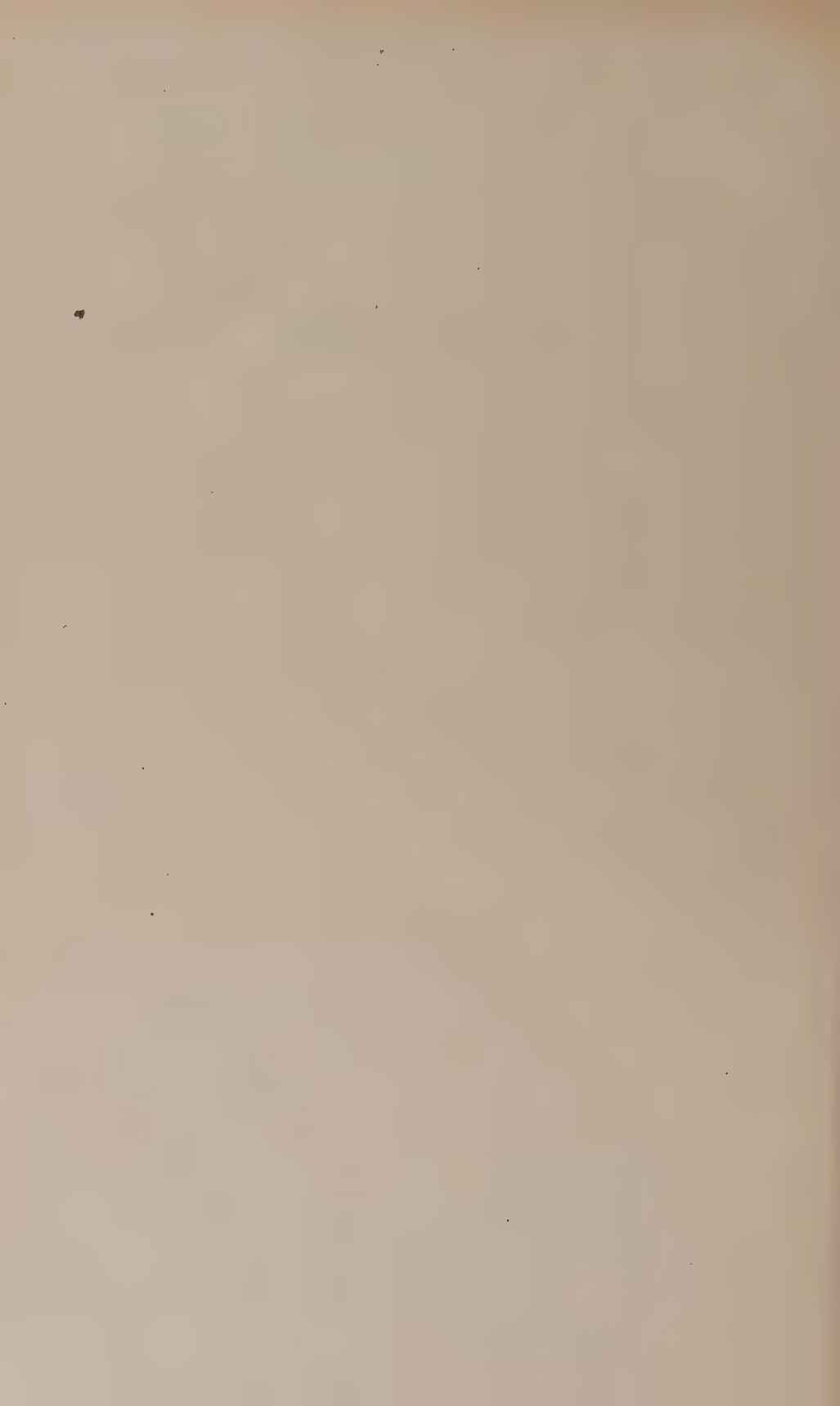
VU

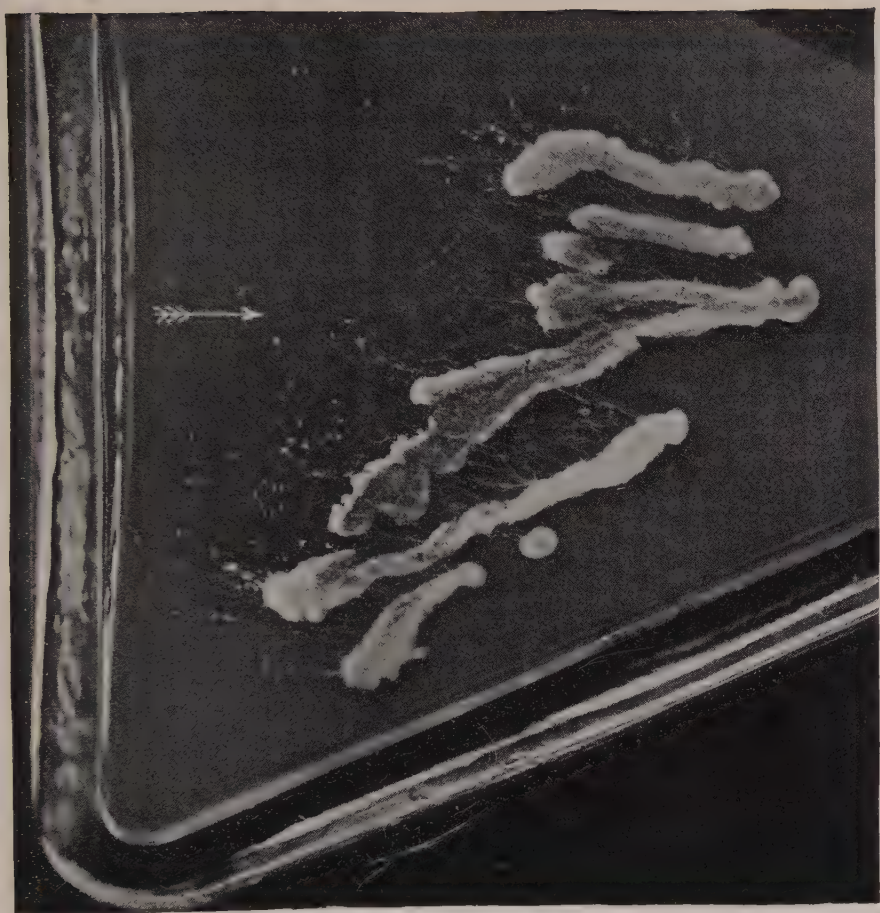
ET PERMIS D'IMPRIMER.

Paris, le 13 mai 1907

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

L. LIARD.





1

3



2

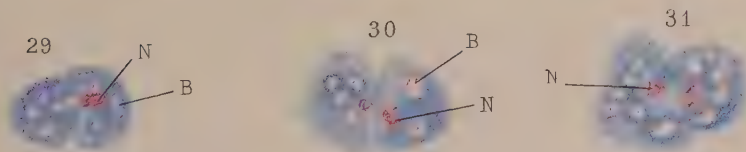
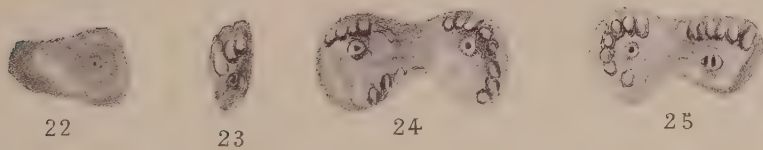
a



a

b

PL. II

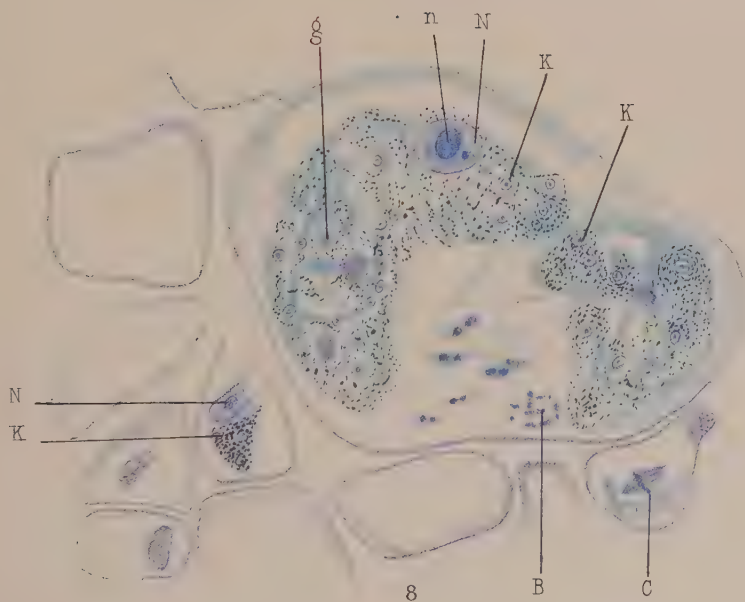
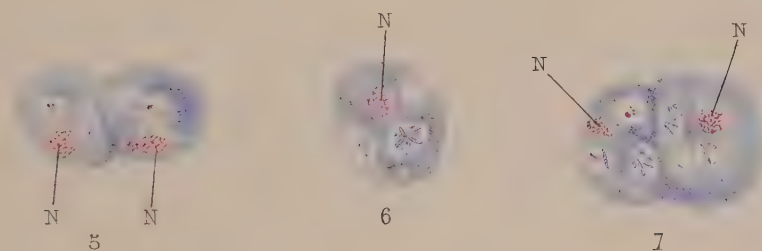
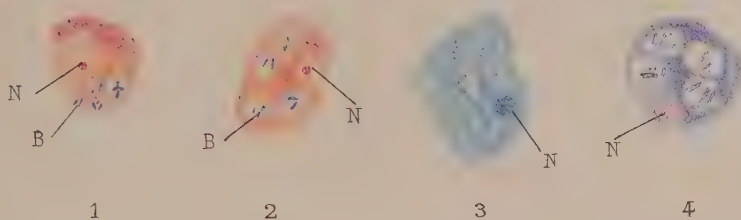


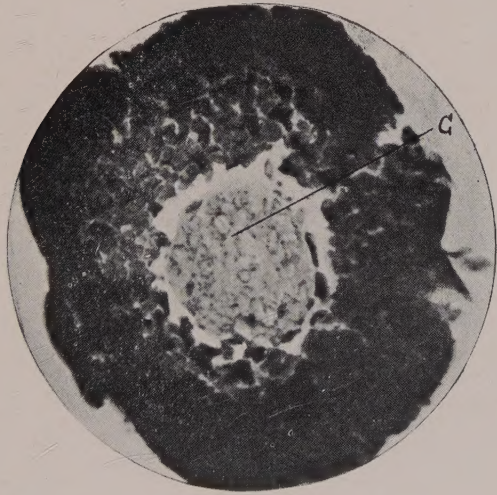
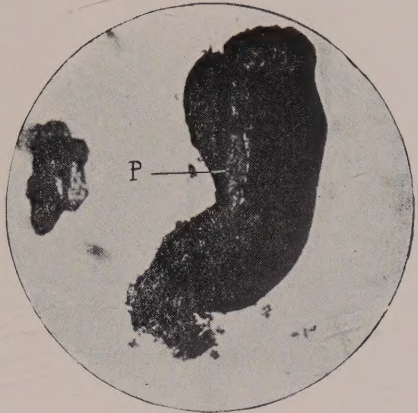
E. Pinoy del.

V. Roussel lith.

Imp. L. Lafontaine, Paris.

PL. III





Jeantel, phot.

Imp. Bouchet, Gusset,

